

Der Einfluss der konstitutiven NF- κ B Aktivität auf die aberrante AP-1 Aktivität beim Hodgkin-Lymphom

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Promotionsfach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe

Jan Ebert

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen:

1. **Prof. Dr. Harald Saumweber**
2. **Prof. Dr. Ann Ehrenhofer-Murray**
3. **Prof. Dr. Claus Scheidereit**

Tag der mündlichen Prüfung:

17. Juni 2015

***„Alles, was die Natur selbst anordnet, ist zu irgendeiner Absicht gut.
Die ganze Natur überhaupt ist eigentlich nichts anderes,
als ein Zusammenhang von Erscheinungen nach Regeln;
und es gibt überall keine Regellosigkeit.“***

Immanuel Kant

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Signaltransduktion	1
1.2	Das Hodgkin Lymphom.....	2
1.3	Die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B Familie	5
1.4	Der klassische und der alternative NF- κ B Signalweg.....	7
1.5	Der MAPK-Signalweg.....	12
1.5.1	Der ERK Signalweg.....	13
1.5.2	Der p38 Signalweg.....	14
1.5.3	Der JNK Signalweg	15
1.6	Die Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie.....	16
1.6.1	Der Transkriptionsfaktor c-Jun aktiviert seine eigene Transkription.....	16
1.6.2	Die Transkription von JunB wird durch NF- κ B reguliert.....	19
1.6.3	Der Transkriptionsfaktor JunD	20
1.6.4	Die Transkriptionsfaktoren der Fos-Familie.....	21
1.6.5	Die Transkriptionsfaktoren der ATF/CREB-Familie.....	21
1.7	Die kooperative Wirkung von NF- κ B und AP-1 im Hodgkin Lymphom.....	22
1.8	Zielstellung	25
2	Material	26
2.1	Geräte und Zubehör	26
2.2	Chemikalien	27
2.3	Enzyme und Kits.....	28
2.4	Bakterienstämme	29
2.5	Zelllinien.....	29
2.6	Plasmide.....	30
2.7	Antikörper.....	31
2.7.1	Primäre Antikörper	31
2.7.2	Sekundäre Antikörper	32
2.8	Lösungen und Puffer.....	33
2.9	Oligonukleotide	35
2.10	Medien	37
2.10.1	Bakterienkulturmedien.....	37
2.10.2	Zellkulturmedien.....	37

3	Methoden	38
3.1	Zellbiologische Methoden	38
3.1.1	Kultivierung adhärenter Zellen	38
3.1.2	Kultivierung von Suspensionszellen	38
3.1.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	38
3.1.4	Behandlung eukaryontischer Zellen mit Stimulatoren	38
3.1.5	Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid DNA	39
3.1.5.1	Transfektion nach der CaPO ₄ -Methode	39
3.1.5.2	Transfektion mittels Lipofektion	39
3.1.5.3	Transfektion durch Elektroporation	40
3.1.6	Stabile Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	40
3.1.7	Gewinnung von Zellextrakten	41
3.2	Nukleinsäuretechniken	41
3.2.1	Ethanolpräzipitation von DNA	41
3.2.2	DNA-Reinigung	41
3.2.2.1	Phenolextraktion	41
3.2.2.2	QIAGEN®-Säulen	42
3.2.2.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	42
3.2.3	Restriktionsanalyse	42
3.2.4	Dephosphorylierung von DNA-Enden	42
3.2.5	Ligation	43
3.2.6	Hybridisierung von Oligonukleotiden	43
3.2.7	Endmarkierung doppelsträngiger DNA mit [³² P]-dATP	43
3.2.8	Die Polymerase Kettenreaktion	43
3.2.9	Präparation von Plasmid-DNA nach der Mini-Methode	44
3.2.10	Präparation von Plasmid-DNA nach der Maxi-Methode	44
3.2.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
3.2.12	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.2.13	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien durch die Calciumchlorid-Methode	45
3.2.14	RNA Isolation	45
3.2.15	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	46
3.2.16	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien durch die Hitzeschockmethode	46
3.2.17	DNA Sequenzierung	46
3.2.18	siRNA/shRNA Design	47
3.3	Proteinchemische und immunologische Techniken	51
3.3.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	51
3.3.2	SDS-PAGE	51
3.3.3	Coomassiefärbung	51
3.3.4	Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Westernblot)	51
3.3.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (Immunodetektion)	51
3.3.6	Chromatographische Methoden	52

3.3.6.1	Ionenaustauscher Chromatographie	52
3.3.6.2	Affinitätschromatographie	53
3.3.7	Immunopräzipitation (IP) von Proteinen	53
3.3.8	Ko-Immunpräzipitation.....	54
3.3.9	Gelretardations-Assay (EMSA)	54
3.3.10	Reportergen Assay und Duale Luciferase Reaktion	55
3.3.11	Analyse der Hodgkin-Zellüberstände mit dem RayBio® Human Inflammation Antibody Array.....	55
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Hohe konstitutive nukleäre AP-1 Aktivität in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien	57
4.1.1	Erhöhte transkriptionelle Aktivität des <i>JUN</i> Promotors in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien	58
4.2	Anreicherung und Identifizierung einer Hodgkin-spezifischen DNA-Bindungsaktivität am <i>JUN</i> Promotor 60	
4.2.1	Aufreinigung eines Hodgkin Zell-spezifischen Proteininteraktion am <i>JUN</i> Promotor.....	63
4.2.1.1	Auftrennung durch Kationenaustauscherchromatographie an SP-Sepharose	64
4.2.1.2	Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose	65
4.2.1.3	Affinitätschromatographie an doppelsträngiger DNA-Cellulose.....	66
4.2.1.4	Affinitätschromatographie am doppelsträngigen <i>JUN</i> Promotorfragment „JunPro78“, gekoppelt an CNBr-aktiverter Sepharose	67
4.2.2	Die am <i>JUN</i> Promotor gereinigten Hodgkin-Zell-spezifischen Fraktionen bestehen aus Komponenten der NF- κ B- und AP-1-Familien.....	68
4.3	Identifizierung von ATF-3 als deregulierte AP-1 Aktivität in Zellen des Hodgkin Lymphoms.....	76
4.4	Konstitutiv aktives NF- κ B bewirkt eine erhöhte AP-1 Aktivität	81
4.4.1	Die Wirkung exokriner Faktoren der Hodgkinzellen auf andere Zellen.....	81
4.4.2	Erhöhte AP-1 Aktivierung durch ektopisch exprimiertes p52	87
4.4.3	Auswirkung einer Depletierung von NF- κ B/p52 auf die Expression von AP-1 Faktoren	92
4.4.3.1	Herunterregulierung von NF- κ B/p52 durch den Superrepressor I κ B α Δ N resultiert in einer verminderten AP-1 Aktivität bei Hodgkinzellen.....	92
4.4.3.2	Herunterregulation von NF- κ B/p52 durch die siRNA-Technologie reduziert die Expression von Mitgliedern der AP-1 Familie in Hodgkinzellen.....	94
5	Diskussion	98
5.1	Hodgkinzellen zeigen eine charakteristische konstitutive NF- κ B und AP-1 Aktivität	98
5.2	Reinigung und Charakterisierung spezifischer an den <i>JUN</i> Promotor gebundener Faktoren in Zellen des Hodgkin Lymphoms	100
5.3	ATF-3 bindet spezifisch an den <i>JUN</i> Promotor in Zellen des Hodgkin-Lymphoms, wird in diesen überexprimiert und reguliert die c-Jun Expression	103
5.4	Die konstitutive NF- κ B Aktivität in Hodgkin-Zellen ist eine Ursache für die persistente Aktivierung von AP-1 in diesen Zellen	105

5.4.1	Die Expression vieler Zytokine, welche von Hodgkin-Zellen verstärkt sekretiert werden, wird durch NF- κ B und AP-1 ko-reguliert	105
5.4.2	Der mit dem <i>JUN</i> Promotor interagierende Transkriptionsfaktor NF- κ B/p52 spielt eine entscheidende Rolle bei der persistenten Aktivierung von AP-1 in den Hodgkinzellen.....	109
5.4.2.1	Eine ektopische stabile Expression von NF- κ B/p52 resultiert in einer Hodgkin-Zell-ähnlichen AP-1 Expression in HEK-293	109
5.4.2.2	NF- κ B/p52 induziert die AP-1 Aktivität in Hodgkinzellen	112
6	Zusammenfassung	119
7	Abkürzungen.....	121
8	Erklärung	124
9	Danksagung	125
10	Abbildungsliste und Tabellenverzeichnis	126
11	Literatur	128

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Unter Signaltransduktion versteht man einen Mechanismus, welcher mechanische und chemische Reize, die auf eine Zelle einwirken, in eine spezifische zelluläre Antwort umwandelt. Die Übertragung der biologischen Information beginnt mit einem Signal an einem Rezeptor an der Zelloberfläche oder im Zellinneren, wird über verschiedene Kinasen im Zellinneren weiter an den Transkriptionsfaktor gegeben, und endet mit einer Veränderung der Zellfunktion. Zellen erhalten eine Vielzahl von Informationen aus ihrer Umgebung, die sowohl die Zellproliferation, die Differenzierung der Zellen, deren Bewegung, als auch den Zelltod beeinflussen (Chen und Greene, 2004; Karin, 2006). Diese Vorgänge sind auch wichtig bei der Embryogenese, bei der Wundheilung und bei der Regulation des Immunsystems (Hayden und Ghosh, 2004). In der Vergangenheit sind eine Reihe von Rezeptoren identifiziert worden, die solche Signale im Inneren der Zelle weiterreichen und damit die Genexpression beeinflussen (O'Neill, *et al.*, 2003; Takeda und Akira, 2004; Brauninger, *et al.*, 2006; Ben-Neriah und Karin, 2011). Die Veränderung der Genexpression wird durch Transkriptionsfaktoren kontrolliert, welche im Zellkern die Transkription entweder aktivieren oder reprimieren. Eine vereinfachte allgemeine schematische Darstellung der zellulären Signaltransduktion ist in **Abbildung 1** gezeigt.

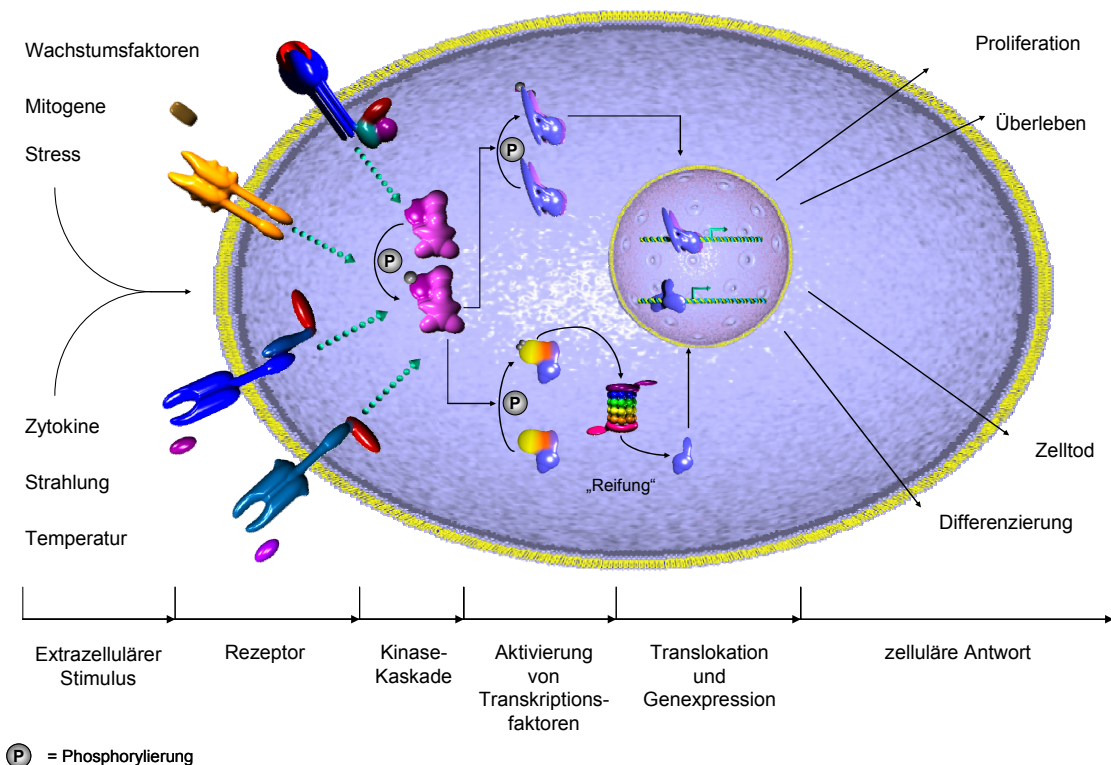


Abbildung 1: Schematische allgemeine Darstellung der Signaltransduktion in einer Zelle durch extrazelluläre Stimuli:

Verschiedenste Aktivatoren (extrazellulärer Stimulus) wirken auf eine Zelle und lösen entweder direkt, über Rezeptoren oder indirekt (Stress, Strahlung, Temperatur) eine Signalkaskade, in die eine Reihe von Kinasen und Adaptermolekülen involviert ist, aus. Auf diese Weise wird das primäre Signal an sein Ziel, die Transkriptionsfaktoren, weitergereicht, welche dann die Genexpression regulieren, und damit eine zelluläre Antwort induzieren.

Induziert durch diverse Stimuli erfolgt die Signalweiterleitung über verschiedene Kinasen zu dem eigentlichen Ziel, den Transkriptionsfaktoren, welche wiederum durch die Regulation der Genexpression unterschiedliche zelluläre Antworten hervorrufen. Eine wesentliche Rolle spielt dabei auch die Art der Zelle sowie deren Differenzierungszustand, da ein und derselbe Stimulus in verschiedenen Zelltypen oder Zellstadien eine unterschiedliche zelluläre Antwort zur Folge haben kann (DiDonato, *et al.*, 2012). Der Untersuchung von Vorgängen bei der Signaltransduktion kommt eine besondere Rolle in der Krebsforschung zu, da in Krebszellen häufig Fehlregulationen von Signaltransduktionsketten vorliegen, die an onkogenen Prozessen beteiligt sind (Karin, 2006; Staudt, 2010).

1.2 Das Hodgkin Lymphom

Das Hodgkin-Lymphom, ist eine der verhältnismäßig gut heilbaren lymphoiden malignen Tumore, und wurde nach dem Arzt Thomas Hodgkin benannt. Im Jahre 1832 beschrieb Thomas Hodgkin mehrere Fälle von Personen mit Symptomen einer Krebserkrankung der Lymphknoten (Hodgkin, 1832). Diese Krankheit wurde mehr als 170 Jahre "Morbus Hodgkin" genannt und erst im späten 20. Jahrhundert dann offiziell in "Hodgkin's Lymphom" umbenannt, als offensichtlich wurde, dass diese Krankheit auf eine Veränderung der Lymphozyten zurückzuführen ist. Diese bewirkt ein unkontrolliertes Wachstum der malignen Zellen. Das Hodgkin-Lymphom wird durch das Vorhandensein von einkernigen "Hodgkin-Zellen", sowie von einem weiteren Zelltyp, den mehrkernigen "Reed-Sternberg-Zellen" von anderen Lymphomenarten unterschieden. Benannt wurden diese mehrkernigen Zellen nach den beiden Wissenschaftlern Dorothy Reed Mendenhall (1874-1964) und Carl Sternberg (1872-1935), welche diese vereinzelt liegenden bis zu 20 µm großen „Riesenzellen“ zum ersten Mal histologisch identifiziert und charakterisiert haben (Sternberg, 1898; Reed, 1902). Die Hodgkin / Reed-Sternberg Zellen (H-RS-Zellen) stammen von den B-Lymphozyten (weißen Blutzellen) aus den Keimzentren der Lymphknoten ab und sind die eigentlichen bösartig (maligne) wachsenden Zellen des Hodgkin Lymphoms. Sehr lange Zeit blieb unklar, aus welcher Ursprungszelle die Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen entstehen, da immunphänotypisch sowohl die Expression von B- und T-Zell-Markern beschrieben wurde, als auch die Abwesenheit von B- oder T-Zell-spezifischen Markern. An Hand der Amplifikation von umgelagerten Immunglobulingen konnte jedoch von Küppers und Rajewsky, 1998 gezeigt werden, dass in den meisten Fällen B-Zellen als Vorläuferzellen der Hodgkin-Reed Sternberg Zellen identifizierte wurden (Kuppers und Rajewsky, 1998; Staudt, 2000).

In den letzten Jahren gab es zwar einen deutlichen Zuwachs unserer Kenntnisse über das Hodgkin-Lymphom, aber die Ursache für die Entstehung dieses Lymphoms ist derzeit noch immer nicht hinreichend geklärt. Es wurden verschiedenste Auslöser dieser Krankheit in der Vergangenheit diskutiert, wie zum Beispiel ein erhöhtes Risiko für die Entstehung dieses Lymphoms durch eine Beteiligung des krebsauslösenden Epstein-Barr-Virus (EBV) (Herbst, *et al.*, 1992; Stein, *et al.*, 1992-a; Lee, *et al.*, 2001; Ambinder, 2007). Neben der zellulären Herkunft und dem Phänotyp der Zellen des Hodgkin Lymphoms ist beispielsweise auf molekularer Ebene eine starke konstitutive NF-kappaB- (NF-κB) (Bargou, *et al.*,

1996; Bargou, *et al.*, 1997) und AP-1-Aktivität (Mathas, *et al.*, 2002) ein wichtiges Charakteristikum dieser Zellen. Die Identifizierung und intensive Untersuchung von Molekülen, die in eine solch starke und permanente NF- κ B Aktivierung in den Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen involviert sind, lieferten in den letzten Jahren viele neue und interessante Erkenntnisse, die in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden (Mathas, *et al.*, 2004; Staudt, 2010; Kuppers, *et al.*, 2012; Ranuncolo, *et al.*, 2012). So konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Hodgkinzellen durch eine Deregulation verschiedener Signalwege und Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet sind. Neben einer konstitutiven Aktivierung des NF- κ B Signalweges ist hier auch der JAK/STAT Signalweg permanent aktiviert (Weniger, *et al.*, 2006). Hodgkinzellen zeigen weiterhin eine konstitutive Aktivierung von Notch1, vermittelt durch seinen Liganden Jagged1, wobei der Notch1 Inhibitor Deltex in diesen Zellen herunterreguliert ist (Jundt, *et al.*, 2002; Jundt, *et al.*, 2004; Jundt, *et al.*, 2008). Weitere deregulierte Signalwege wie der PI3K/AKT-Weg und der MAPK/ERK-Weg sind ebenfalls kennzeichnend für die Hodgkinzellen (Zheng, *et al.*, 2003; Dutton, *et al.*, 2005).

Des Weiteren wird von Lee, *et al.*, 2001 das Epstein-Barr-Virus LMP-1 (**L**atentes **M**embran **P**rotein **1**) diskutiert, welches *in vitro* durch eine erzwungene Herunterregulation von CD99 (T-Zellen Oberflächen-Glykoprotein E2) in B-Zellen einen typischen Hodgkin-/Reed-Sternberg Phänotyp induziert. Eine bedeutende Rolle soll auch der Störung des Immunsystems bei der Entstehung dieser Krankheit zukommen. So wird zum Beispiel ein vermehrtes Auftreten des Hodgkin Lymphoms nach dem Einsatz von Immunsuppressiva beobachtet, wie beispielsweise nach der Transplantation von Organen.

Die konstitutive NF- κ B Aktivität ist ein molekulares Charakteristikum der Hodgkin-Zellen. Sie entsteht entweder durch die persistente Aktivierung von Signalkinasen oder durch Mutationen der I κ B kodierenden Gene, die beide zur Inaktivierung der I κ B Untereinheiten führen (Rayet und Gelinas, 1999).

In den vergangenen 20 Jahren wurden in verschiedenen Arbeiten molekulare Mechanismen und Ursachen zur Pathogenese des Hodgkin Lymphoms vorgeschlagen. So konnte gezeigt werden, dass die Expression des I κ B α Transkriptes (mRNA) gegenüber anderen Zelllinien wie zum Beispiel Jurkat und Daudi in Hodgkinzelllinien signifikant erhöht ist (Bargou, *et al.*, 1996; Wood, *et al.*, 1998; Cabannes, *et al.*, 1999). Auf der Proteinebene zeigt sich für I κ B α hingegen keine verstärkte Akkumulation. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen eine starke anhaltende Aktivierung der I κ B Kinase (IKK) aufweisen, wodurch es zu einer verstärkten Phosphorylierung und Degradation von I κ B α bei gleichzeitiger transkriptioneller Aktivierung von NF- κ B kommt (Krappmann, *et al.*, 1999). Ein weiterer Befund, den eine Analyse von I κ B α ergab, zeigte, dass einige Hodgkinzelllinien Mutationen in I κ B α aufweisen. So findet man beispielsweise in der Zelllinie L428 eine C-Terminal verkürzte Isoform von 30 kDa, und in der Linie KMH-2 sogar nur eine 18 kDa Variante des normalerweise 40 kDa I κ B α Proteins, denen die Fähigkeit zur Bindung an NF- κ B fehlt (Wood, *et al.*, 1998; Cabannes, *et al.*, 1999; Emmerich, *et al.*, 1999). Es sei hier noch erwähnt, dass die Expression des I κ B α Proteins unter der Kontrolle von NF- κ B steht. Damit reguliert NF- κ B die Expression seines eigenen Inhibitors (de Martin, *et al.*, 1993; Le Bail, *et al.*, 1993; Chiao, *et al.*, 1994).

Sowohl der NF- κ B Signalweg als auch der AP-1 Signalweg sind in den Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen konstitutiv aktiviert. In den folgenden Kapiteln wird näher auf die Komponenten beider Signalwege eingegangen und abschließend auf Besonderheiten des Hodgkin Lymphoms hinsichtlich dieser beiden wichtigen Signalwege eingegangen.

1.3 Die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B Familie

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde erstmals von Sen und Kollegen im Jahr 1986 (Sen und Baltimore, 1986) als ein nukleärer Faktor beschrieben, der in B-Zellen an der Transkription der Ig κ Kette beteiligt ist und, wie sich später herausstellte, in fast allen Säugerzellen vorkommt. Er spielt eine zentrale Rolle beim Zellwachstum und der Differenzierung von Zellen, bei der Regulation von akuten Entzündungsreaktionen (Akute-Phase-Reaktion) sowie bei der Aktivierung der Lymphozyten, der Regulation des induzierten Zelltodes (Apoptose) und bei der Entstehung verschiedener Tumoren hämatologischen Ursprungs (Baeuerle und Henkel, 1994; Pahl, 1999). Aber auch in Fällen anderer Tumorarten, wie zum Beispiel Brustkrebs, Melanom, Kolonkarzinom, Lungenkarzinom und Prostatakarzinom ist eine konstitutive NF- κ B Aktivierung beschrieben worden (Lind, *et al.*, 2001; Stathopoulos, *et al.*, 2008; Gartel, 2012; Yoneda, *et al.*, 2013).

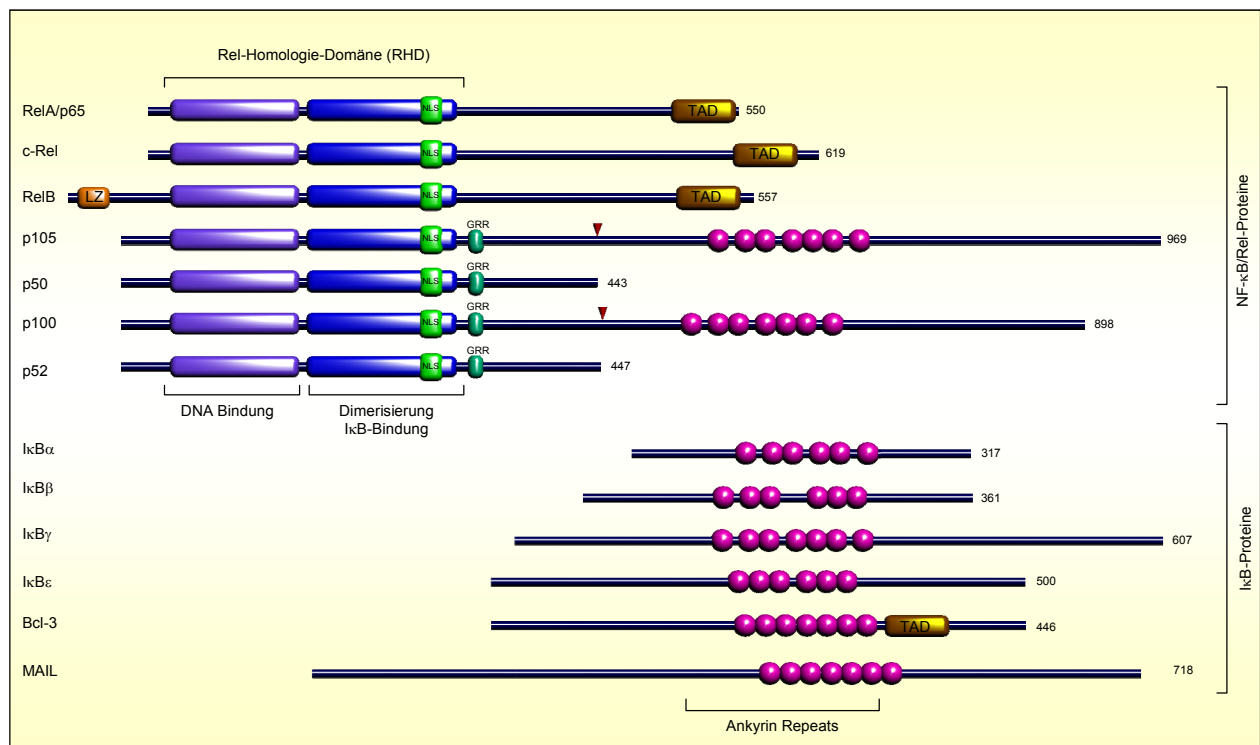


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Strukturen einiger wichtiger NF- κ B- und I κ B-Proteine:

Abgebildet sind die generalisierten Strukturen der beiden Klassen von Rel Transkriptionsfaktoren. Die Zahl der Aminosäuren in jedem Protein ist auf der rechten Seite angezeigt. Alle Proteine haben eine konservierte DNA-Bindungs- und /Dimerisierungs-Domäne die sogenannte Rel-Homologie (RH)-Domäne, die auch Sequenzen wichtig für Kerntranslokation und die Bindung eines I κ B-Inhibitors enthält. Die Klasse-I-Proteine (p105/p50 und p100/p52) besitzen noch zusätzliche Sequenzen in der RH-Domäne. Die C-terminalen Hälften der Klasse I Proteine haben eine Ankyrin Repeat enthaltende inhibitorische Domäne, die durch eine Proteasom-vermittelte Proteolyse entfernt werden kann. Die endoproteolytischen Spaltstellen sind hier durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die C-terminalen Hälften der Klasse II Rel Proteine (c-Rel, RelB und RelA/p65) haben Transkriptionsaktivierung Domänen (TAD). Gruppirt wurden die NF- κ B/Rel Proteine (oben) und die I κ B-Proteine (unten). **I κ B**, Inhibitor von NF- κ B; **RHD**, Rel-Homologie-Domäne; **TAD**, Transaktivierungsdomäne; **LZ**, Leucin-Zipper-Domäne von RelB; **GRR**, Glycinreiche Region; **NLS**, Kernlokalisierungssequenz; **MAIL**, Molecule-possessing Ankyrin repeats Induced by Lipopolysaccharide. Verändert nach Chen und Greene, 2004.

Eine persistente Aktivierung von NF- κ B findet man weiterhin bei Krankheiten wie Arthritis, Asthma und verschiedenen chronischen Entzündungserkrankungen (Ben-Neriah und Karin, 2011).

In Säugetieren existieren fünf verschiedene Untereinheiten von NF- κ B Faktoren: p50/p105, p52/p100, p65 (RelA), c-Rel und RelB. Allen NF- κ B Faktoren gemeinsam ist eine homologe DNA-Bindungs- und Dimerisierungs-Domäne, die sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD) mit einer Länge von etwa 300 AS. Diese Domäne vermittelt die Dimerbildung mit anderen NF- κ B Proteinen, die Bindung an I κ B Proteine (NF- κ B Inhibitoren), die DNA-Bindung und den Transport in den Zellkern über ein nukleäres Lokalisations-Signal (NLS).

Die Mitglieder der NF- κ B Familie werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die Proteine p50 und p52 in der ersten Gruppe werden als die Vorläufermoleküle p105 und p100 synthetisiert und durch Proteasom-vermittelte endoproteolytische Abspaltung des C-terminalen Molekülteils aktiviert. Dieser C-Terminus besitzt Ankyrin-Repeats, die charakteristisch sind für NF- κ B Inhibitoren, den I κ B Proteinen. Dementsprechend können p105 und p100 als I κ B Proteine fungieren und damit NF- κ B Faktoren im Zytoplasma zurückhalten. Zur zweiten Gruppe gehören die Proteine c-Rel, p65 und RelB, die über ihre Transaktivierungsdomäne (TAD) an der Expression von κ B regulierten Genen beteiligt sind (Abbildung 2). Das κ B DNA-Bindemotiv befindet sich in den regulatorischen Abschnitten zahlreicher Gene und wird von den Mitgliedern der NF- κ B Familie erkannt. Eine Bindung an dieses Motiv verstärkt in den meisten Fällen die Transkription der jeweils abhängigen Gene.

Mit Ausnahme des Transkriptionsfaktors RelB besitzen alle NF- κ B Faktoren die Eigenschaft sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden. RelB hingegen bildet nur Heterodimere mit p50, p52 und p65, jedoch keine Homodimere. Der p65/RelB-Komplex wurde jedoch als transkriptionell inaktiv beschrieben (Marienfeld, *et al.*, 2003). Abhängig vom jeweiligen Zelltyp und ihrem Aktivierungsstadium findet man eine unterschiedliche Homo- bzw. Heterodimer-Komposition von NF- κ B im Zytoplasma und Kern. In den meisten unstimulierten Zellen befinden sich die NF- κ B Faktoren gebunden an I κ B Proteine im Zytoplasma (Baeuerle und Baltimore, 1988). In der Zelle existieren verschieden **I κ B**-Proteine („Inhibitor of **κ B**“), welche unterschiedliche Bindungsaffinitäten für bestimmte NF- κ B Komplexe besitzen, jeweils leicht unterschiedlich reguliert, sowie gewebsspezifisch exprimiert werden (Karin, 1999). Zu diesen Inhibitoren gehören die Proteine I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , BCL3, MAIL sowie auch die carboxyterminalen Anteile von p105 und p100 (Ghosh, *et al.*, 1998; Chen und Greene, 2004). Die Degradation der I κ B Proteine erfolgt als Antwort auf die verschiedensten Stimuli, von denen weit mehr als 100 bekannt sind (z.B. Interleukine, TNF- α , Lymphotoxin, Lipopolysaccharid (LPS), Ionophore, Phorbol ester, UV und DNA-Damage). Dieser Abbau der I κ B Proteine, beziehungsweise der Vorläuferproteine p105 und p100, ist mehrstufig und endet mit der Freisetzung der NF- κ B Proteine, welche dann in den Zellkern translozieren. Im Einzelnen erfolgt hierbei die Phosphorylierung der I κ B Proteine an spezifischen Aminosäuren durch den IKK-Komplex (I κ B Kinasekomplex). Dieses wiederum resultiert dann in einer K48-Polyubiquitinierung des Proteins gefolgt von der Degradation durch das 26S-Proteasom (Mellits, *et al.*, 1993; Palombella, *et al.*, 1994; Orian, *et al.*, 1995; Hinz und Scheidereit,

2014). Die Translokation der freigesetzten NF- κ B Proteine erfolgt über deren Kernlokalisierungssequenz, die NLS, welche erst nach der Degradation des I κ B Proteins funktionell wird.

1.4 Der klassische und der alternative NF- κ B Signalweg

Die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B Familie werden schnell als Reaktion auf verschiedenste Reize aktiviert. Dies führt zu einer schnellen Aktivierung von Zielgenen, welche unter anderem für Proteine der unterschiedlichsten Funktionen kodieren. Diese kodieren unter anderem **Zytokine** wie den Tumornekrose Faktor α (TNF- α), Interleukine (IL-1, IL-2, IL-6 IL-13) und Interferon- β (IFN- β), **Wachstumsfaktoren** wie G-CSF und GM-CSF, **Membranproteine** wie den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I (MHC I), das intrazelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) und E-Selectin. Aber auch **Transkriptionsfaktoren** wie p100, p105, c-Rel, RelB, JunB, p53, GATA3, c-Myc, C/EBP δ und die Interferon-regulatorischen Faktoren IRF-1, IRF-2, IRF-4 und IRF-7 ebenso wie die **regulatorischen Proteine** A20, I κ B α , I κ B ϵ und MAIL und **Regulatoren der Apoptose** wie das zelluläre FLICE-ähnliches inhibitorisches Protein (c-FLIP), Fas-Ligand und Bcl-X_L (Pahl, 1999) gehören dazu.

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Aktivierung des NF- κ B Signalweges als Antwort auf die verschiedensten Reize, die auf die Zelle einwirken. Der wichtigste und am besten untersuchte Aktivierungsweg der von den meisten Reizen ausgelöst wird, ist der **klassische** (kanonische) **NF- κ B Signalweg**, der vor allem für die Aktivierung von p50:p65(RelA) und p50:c-Rel Heterodimeren verantwortlich ist (**Abbildung 3**). Die bekanntesten, jedoch nicht exklusiven, Stimulatoren dieses Signalweges sind beispielsweise TNF α , welches diesen Signalweg über den TNF-Rezeptor-1 auslöst, das Lipopolysaccharid (LPS), welches die Signalkaskade über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) aktiviert aber auch Interleukin-1 β und TGF- β . Durch die Bindung der Stimulatoren an ihren jeweils spezifischen Rezeptor wird das Signal über verschiedene intrazelluläre Adapter-Proteine und rezeptorassoziierte Proteine an den **I κ B Kinase Komplex (IKK)** weitergegeben.

Der IKK-Komplex besteht aus den beiden katalytisch aktiven Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO) und spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von NF- κ B (Karin, 1999). Zur oligomeren Zusammensetzung des IKK-Komplexes wurden von unterschiedlichen Arbeitsgruppen Untersuchungen durchgeführt. Da sowohl IKK α als auch IKK β über ein Leuzin-Zipper-Motiv auch in Abwesenheit von IKK γ stabile Homodimere und Heterodimere bilden können, und auch IKK γ stabile Multimere zu bilden vermag, wurde vermutet, dass der IKK-Komplex aus einem IKK α -IKK β Heterodimer assoziiert mit einem Dimer oder Trimer von IKK γ besteht (Rothwarf, *et al.*, 1998; Yamaoka, *et al.*, 1998). Etwas später wurde diese Theorie präzisiert mit einem 1:1 Verhältnis von katalytischen IKK Untereinheiten (α oder β) zu IKK γ vorgeschlagen (Krappmann, *et al.*, 2000; Miller und Zandi, 2001). Ein weiterer Befund beschreibt eine Struktur aus vier IKK γ Untereinheiten assoziiert mit insgesamt je zwei IKK α und IKK β Molekülen mit einer Stöchiometrie von $\gamma_4(\alpha/\beta)_4$ (Tegethoff, *et al.*, 2003). Aktuelle Daten lieferten zusätzlich wertvolle Informationen zu Struktur von IKK β , welches eine Trimodulare Struktur aufweist. So besteht IKK β aus einer N-terminalen Kinase-Domäne (KD), einer

zentralen Ubiquitin-ähnlichen Domäne (ULD) und einer länglichen α -helikalen Scaffold/Dimerisierungsdomäne (SDD) am C-terminus (Xu, *et al.*, 2011). Die Dimerisierung von IKK β erfolgt über die SDD, wobei das ursprünglich beschriebene Leuzin-Zipper-Motiv (LZ) und das HLH-Motiv zwar in der SDD enthalten sind, jedoch zeigte die Struktur, dass die meisten hydrophoben Reste im vorhergesagten LZ-Motiv nach innen gerichtet sind, und das LZ-Motiv selbst damit keine Dimerisierung vermitteln kann (Liu, *et al.*, 2013). Hinsichtlich der Architektur des IKK-Komplexes wurden die verschiedensten Modelle vorgeschlagen, dennoch lässt sich allgemein festhalten obwohl die dreigliedrige Struktur IKK die vielleicht am häufigsten vorkommende Form ist, könnten andere IKK-Komplexe existieren. So haben Co-Expressionsversuche und *in vitro*-Studien gezeigt, dass IKK γ auch mit IKK α oder IKK β Homodimeren interagieren kann (Krappmann, *et al.*, 2000; Miller und Zandi, 2001; Hinz und Scheidereit, 2014).

Im Jahr 1997 wurde das IKK Signalosom erstmals als ein 900 kDa Komplex gereinigt (DiDonato, *et al.*, 1997; Mercurio, *et al.*, 1997; Zandi, *et al.*, 1997). Die Molekulargewichte der Einzelkomponenten des Komplexes betragen für IKK α 85 kDa, für IKK β 87 kDa und für IKK γ 52 kDa. Da selbst die von Tegethoff, *et al.*, 2003 vorgeschlagene Zusammensetzung rein rechnerisch nur maximal 552 kDa erreicht, wurde nach weiteren assoziierten Faktoren gesucht. So wurde beispielsweise mit dem IKK-Komplex das 150 kDa Protein IKAP (IKK assoziiertes Protein) aufgereinigt (Cohen, *et al.*, 1998). Als ein weiteres Protein, welches sowohl mit den beiden katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes als auch mit IKK γ zu interagieren vermag, ist das 105 kDa Protein ELKS (Ducut Sigala, *et al.*, 2004) beschrieben worden. Aber auch das Ko-Chaperon cdc37 und das Hitzeschockprotein HSP90 wurden im Komplex mit IKK identifiziert und als Regulatoren der Kinaseaktivität dieses Komplexes analysiert (Chen, *et al.*, 2002; Broemer, *et al.*, 2004; Hinz, *et al.*, 2007). HSP90 spielt dabei nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Stabilität des IKK-Komplexes, sondern auch bei der Stabilität anderer Proteine wie zum Beispiel RIP (Lewis, *et al.*, 2000). Die Interaktion von HSP90 mit dem IKK-Komplex wird dabei durch cdc37 vermittelt (Hinz, *et al.*, 2007).

Der **klassische Signalweg** teilt sich „stromabwärts“ vom IKK-Komplex einerseits in die Freisetzung I κ B-gebundener NF- κ B Dimere, andererseits in die Vorstufenprozessierung von p105 zu p50. Hierbei wird die C-terminale Ankyrin Repeats enthaltende inhibitorische Domäne, welche homolog zu I κ B Proteinen ist, abgespalten (vergleiche **Abbildung 2**) und p50 freigesetzt. Dieses kann nun durch sein „sichtbares“ nukleäres Lokalisations-Signal (NLS) in den Kern translozieren (Baeuerle und Henkel, 1994).

In den meisten Zelltypen liegen im unstimulierten Zustand der Zelle die NF- κ B Dimere inaktiv im Zytoplasma an eines der Mitglieder der I κ B Familie gebunden vor. Zu diesen Inhibitoren gehören unter anderem I κ B α , I κ B β , I κ B γ und I κ B ϵ , die an die RHD von NF- κ B binden und somit das NLS-Motiv verdecken. BCL3 ist ein nukleäres I κ B-Homolog, welches als Transkriptionsaktivator wirken kann (**Abbildung 2**; Ghosh, *et al.*, 1998; Chen und Greene, 2004). Werden die I κ B Proteine nun durch den IKK-Komplex phosphoryliert kommt es in Folge zu einer K48-Ubiquitinierung des Proteins, vermittelt durch die Ubiquitin-Ligase-Maschinerie (SCF^(β -TrCP)), und anschließend zur Degradation durch das 26S

Proteasom unter Freisetzung des gebundenen NF- κ B Dimers. Die nun freigegebene NLS der NF- κ B Proteine, die zuvor durch das jeweilige I κ B Protein verdeckt wurde, ermöglicht die Translokation von NF- κ B in den Kern, um dort mit spezifischen DNA-Sequenzen im Promotor seiner Zielgene zu interagieren (**Abbildung 2**; Bonizzi und Karin, 2004; Hinz und Scheidereit, 2014).

Neben dem klassischen NF- κ B Signalweg gewinnt in den letzten Jahren der **alternative NF- κ B Signalweg** zunehmend an Bedeutung (**Abbildung 3**). Dieser Signalweg wurde erstmals von Xiao, *et al.*, 2001 und Senftleben, *et al.*, 2001 beschrieben. Er führt ebenfalls zur Translokation von NF- κ B Dimeren, vorrangig p52/RelB, in den Zellkern. Der alternative Signalweg ist strikt abhängig von IKK α und benötigt weder IKK β , noch IKK γ (Senftleben, *et al.*, 2001). Er kann über den LT- β -Rezeptor und CD40, die beide zur **TNF-Rezeptor (TNFR)** Superfamilie gehören, und den BAFF-Rezeptor vermittelt werden. Aktiviert wird dieser Signalweg unter anderem durch Lymphotoxine, wie zum Beispiel Lymphotoxin α_1/β_2 (LT α_1/β_2), über den LT- β -Rezeptor (Yin, *et al.*, 2001; Müller und Siebenlist, 2003; Yilmaz, *et al.*, 2003). Ein weiterer Ligand, der mit dem LT- β -Rezeptor interagiert ist LIGHT, ein Ligand der TNF-Superfamilie (Bodmer, *et al.*, 2002). CD40 ist, ebenso wie der LT- β -Rezeptor, ein Mitglied der TNF Rezeptor (TNFR) Superfamilie und spielt eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort (Calderhead, *et al.*, 2000).

Die Ligation dieses Rezeptors wird von Coope und Kollegen als Auslöser der Prozessierung des Vorstufenproteins p100 zu p52 beschrieben (Coope, *et al.*, 2002). CD40 wird auf B-Zellen und bestimmten akzessorischen Zellen exprimiert. Der Ligand für CD40, CD154, wird auf aktivierten CD4+ T-Zellen exprimiert und ist der Auslöser klonaler Vermehrung und Differenzierung von B-Lymphozyten. CD40–CD154 Interaktionen sind unter anderem für die Entwicklung der Thymus-abhängigen humoralen Immunität erforderlich (Calderhead, *et al.*, 2000). Die Ligation des BAFF-Rezeptors, induziert durch den „B-cell activating factor“ (BAFF), wird von Claudio und Kollegen in Zusammenhang mit der IKK γ (NEMO) unabhängigen Prozessierung von p100 in B-Zellen gebracht (Claudio, *et al.*, 2002). Aber auch die Stimulation mit Lipopolysaccharid, welche bereits für die Aktivierung des klassischen Signalweges erwähnt wurde, induziert den alternativen Signalweg (Senftleben, *et al.*, 2001; Mordmüller, *et al.*, 2003).

Die Stimulation des alternativen NF- κ B Signalweges ist langsam und abhängig von der *de novo* Proteinsynthese aufgrund des ungewöhnlichen Mechanismus der NIK-Aktivierung (Beinke und Ley, 2004). Die Proteinkinase **NIK** (NF- κ B Inducing Kinase) gehört zur Familie der MAP3K, ist eine der Schlüsselkinasen des alternativen Signalweges und bewirkt die Phosphorylierung der im Signalweg unterhalb gelegenen Kinase IKK α . Die Menge an NIK in der Zelle ist unter normalen Bedingungen sehr gering, da dieses Protein einer permanenten Degradation über einen TRAF3-abhängigen Mechanismus unterliegt. Dabei interagiert **TRAF3** (TNF Rezeptor Associated Factor 3) mit einer N-terminal lokalisierten Domäne von NIK und induziert dessen Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau (Liao, *et al.*, 2004).

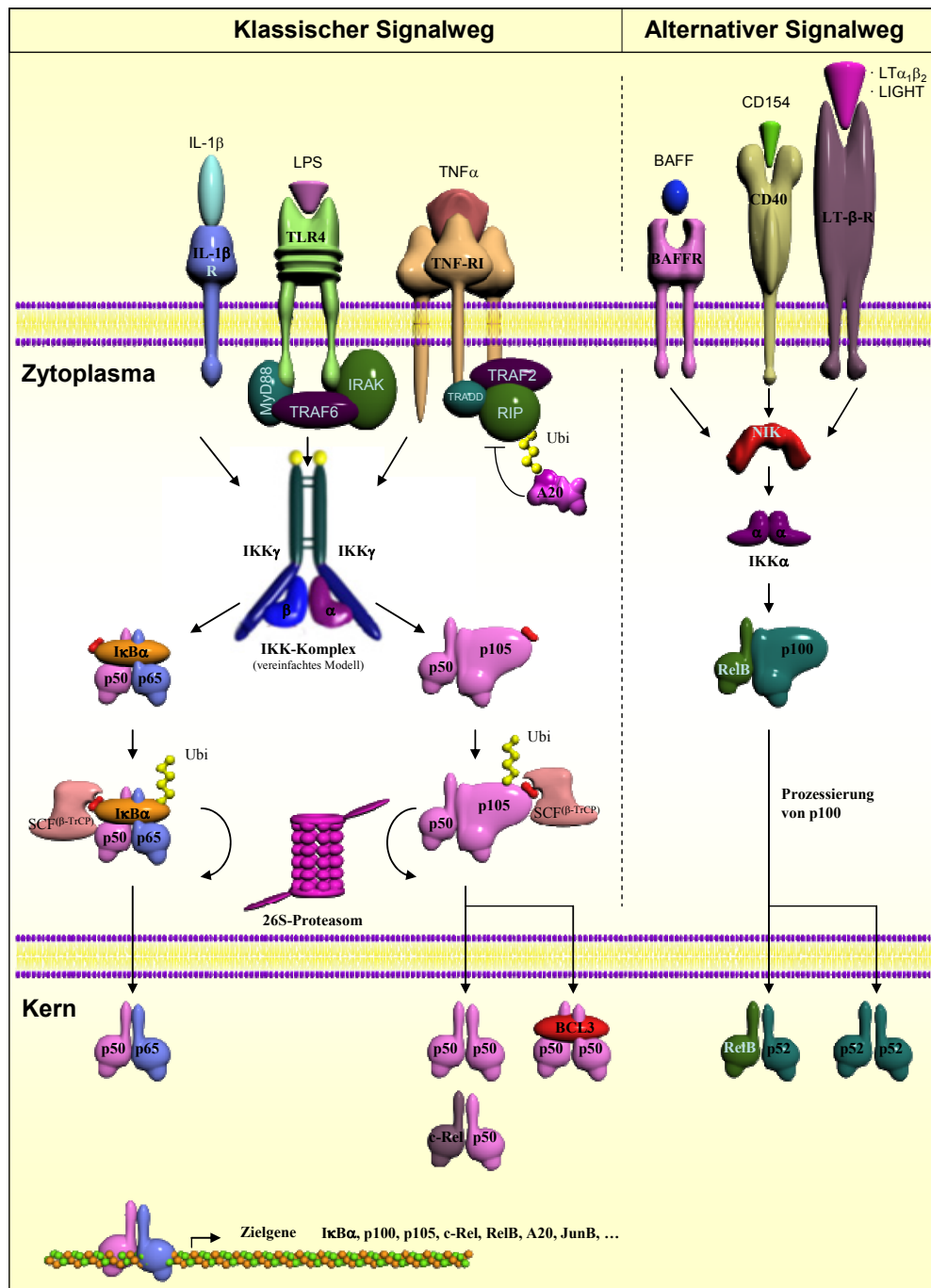


Abbildung 3: Der klassische und der alternative NF-κB Signalweg:

Stark vereinfachte Darstellung des klassischen (links) und des alternativen (rechts) NF-κB Signalweges mit seinen wichtigsten Komponenten. Eine Auswahl von Rezeptoren und Liganden, welche den jeweiligen Signalweg in den Zellen induzieren sind ebenso illustriert, wie die verschiedenen Schritte, die zum aktiven Transkriptionsfaktor führen. Die Angabe der Zielgene umfasst ebenfalls nur eine sehr geringe Auswahl der tatsächlichen NF-κB regulierten Gene.

Die Liganden-abhängige Stimulation über CD40, den BAFF-Rezeptor oder den LT-β-Rezeptor induziert den Abbau von TRAF3 und resultiert damit in der Stabilisierung von NIK. Die schnelle Neusynthese von NIK führt unter diesen Bedingungen zur Akkumulation dieser Kinase im Zytoplasma, was infolge zur Aktivierung von IKKα führt. Neueste Untersuchungen der Aktivierung von IKKα durch NIK ergaben, dass phosphoryliertes IKKα auch in einer negativen Rückkopplung auf NIK wirkt und dieses zu destabilisieren vermag (Razani, *et al.*, 2010; Sun, 2010). IKKα phosphoryliert nun das Vorläuferprotein p100, was entscheidend für dessen Prozessierung zu p52 ist. Nachdem die IκB-ähnliche inhibitorische C-

terminale Hälfte von p100 durch das 26S Proteasom abgebaut wurde, kann das NF- κ B Dimer, welches sich beim alternativen Signalweg meist aus p52 und RelB zusammensetzt, in den Kern wandern und dort seine Zielgene aktivieren oder reprimieren (Bonizzi und Karin, 2004). Die Stabilisierung von NIK, durch Proteasom-Inhibition, induziert auch eine verzögerte Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges nach Stimulation des LT- β -Rezeptors, durch die vermehrte Expression proinflammatorischer Zytokine (Zarnegar, *et al.*, 2008). TRAF3 induziert zwar die Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von NIK, ist aber keine direkte E3-Ligase für dieses Protein (Liao, *et al.*, 2004). Die Studien von Varfolomeev und Vince haben gezeigt, dass die NIK Stabilität durch **c-IAP1** und **c-IAP2** (zellulärer Inhibitor der Apoptose) geregelt wird (Varfolomeev, *et al.*, 2007; Vince, *et al.*, 2007), welche über ihre C-terminalen **RING** Domänen (**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene) als E3-Ligasen fungieren, dabei NIK an K48 ubiquitinieren, was in Folge zum Abbau durch das Proteasom führt. Die Interaktion dieser c-IAPs wird vermittelt über die Adapterfunktion von **TRAF2**. TRAF2 dimerisiert dabei mit TRAF3 und interagiert auf diese Weise physikalisch mit den c-IAPs und mit NIK (Gardam, *et al.*, 2008). Die Liganden-abhängige Stimulation des alternativen NF- κ B Signalweges führt neben dem Abbau von TRAF3 auch zur Degradation von TRAF2 und damit zur Stabilisierung von NIK. Sowohl TRAF3 als auch TRAF2 fungieren auf diese Weise als negative Regulatoren der p100 Prozessierung (Vallabhapurapu, *et al.*, 2008).

1.5 Der MAPK-Signalweg

Neben der starken konstitutiven NF- κ B Aktivierung in Hodgkinzellen ist auch eine konstitutive Aktivierung von AP-1 zu beobachten (Mathas, *et al.*, 2002). Im Zentrum der Aktivierung verschiedener Mitglieder der AP-1 Familie stehen die MAP-Kinasen.

Die Regulation des Zellwachstums in mehrzelligen Organismen ist ein komplexer Prozess, welcher in erster Linie durch exokrine Wachstumsfaktoren reguliert wird, die von den umgebenen Zellen sekretiert werden. Die MAPK Signalwege sind gekennzeichnet durch eine Serie von Proteinkinase-Kaskaden, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums spielen (Abbildung 4).

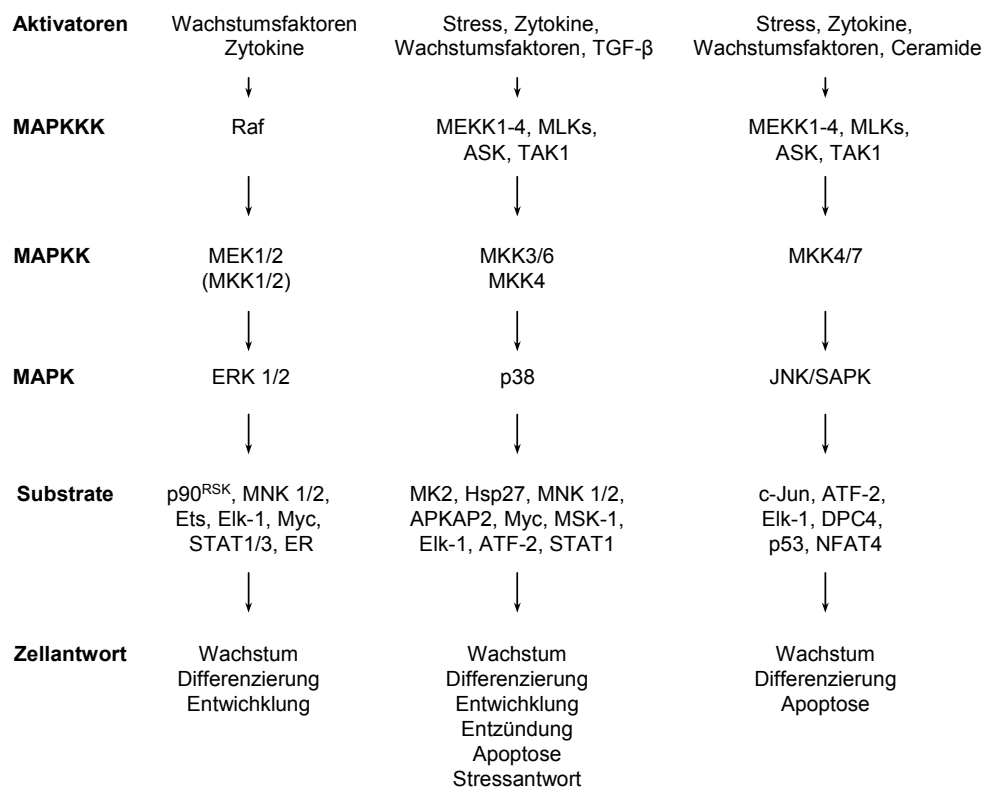


Abbildung 4: Die wichtigsten MAP-Kinase Kaskaden in Zellen der Säugetiere:
nach Zhang und Liu, 2002

Die Familie der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) umfasst die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (**ERK**-Subfamile), **p38** und die c-Jun NH₂-terminale Kinase (**JNK**). Jeder MAPK-Signalweg ist gekennzeichnet durch das sogenannte „core signalling module“. Es besteht mindestens aus den folgenden drei Komponenten, einer **MAPK-Kinase-Kinase** (MAP3K), einer **MAPK-Kinase** (MAP2K) und einer MAPK. Die MAPK werden durch diverse extra- und intrazelluläre Stimuli, einschließlich Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen und verschiedenen zellulären Stressfaktoren wie zum Beispiel oxidativer Stress, aktiviert. Diese verschiedenen Signalwege der MAPK regulieren eine Vielzahl von zellulären Aktivitäten wie Proliferation, Differenzierung, das Überleben der Zellen sowie deren Tod. Abweichungen von der strikten Kontrolle durch die MAPK Signalwege werden oft in

Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Krankheiten, wie die Alzheimer Erkrankung, das Parkinson-Syndrom und verschiedener Arten von Tumoren, gebracht (Roberts und Der, 2007; White, *et al.*, 2007; Munoz und Ammit, 2010). Eine lang anhaltende Aktivierung des JNK und p38 Signalweges wird beispielsweise für die neuronale Apoptose bei der Alzheimer Erkrankung und dem Parkinson-Syndrom verantwortlich gemacht, während der ERK Signalweg eine wichtige Rolle in verschiedenen Schritten der Tumorgenese spielt, einschließlich der Proliferation der Krebszellen, sowie deren Migration und Invasion (Kim und Choi, 2010). Auf die wichtigsten MAP-Kinasen im Zusammenhang mit AP-1 wird in den folgenden drei Abschnitten genauer eingegangen.

1.5.1 Der ERK Signalweg

Die durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase, **ERK**, ist eine der wohl am besten charakterisierten MAPK aus der Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen und der Raf-MEK-ERK-Signalweg repräsentiert einen der am besten untersuchten MAP-Kinase Signalwege dieser Proteinfamilie. Durch die Stimulation von Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTK) kommt es zu einer Aktivierung der MAP-Kinase in einem mehrstufigen Prozess. Die beiden wichtigsten Proteinkinasen dieses Signalweges sind ERK1 und ERK2 (Synonyme: p44/p42 MAPK, Herskowitz, 1995; Kyriakis und Avruch, 1996). Die Aktivitäten dieser beiden MAP-Kinasen ist von einer gleichzeitigen Phosphorylierung von je einem Threoninrest und einem Tyrosinrest durch eine MAPK-ERK-Kinase (MAP2K: MEK) abhängig (Vincent, *et al.*, 1998). Dabei sind die Isoformen MEK1 und MEK2 besonders spezifisch für die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2. Die MAPK-ERK-Kinasen wiederum werden durch die vorgeschalteten MAP3K/MEK-Kinasen (MEKK) phosphoryliert. Spezifisch für MEK1 und MEK2 ist beispielsweise die Proteinkinase Raf. Diese aktiviert die MAPK-ERK-Kinase durch gleichzeitige Phosphorylierung von je einem Serinrest und einem Threoninrest. Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 spielen damit eine zentrale Rolle im Signalweg der regulatorischen Ras-GTPase (Kyriakis, *et al.*, 1992; Marshall, 1995). Während einer Entzündungsreaktion wird der ERK1/2-Signalweg durch einige Zytokin-Rezeptoren, wie den Interleukin-6(IL-6)-Rezeptor, den T-Zell-Rezeptor, CD28 und den B-Zell-Rezeptor aktiviert. Eine verstärkte ERK1/2 Aktivität führt zu der Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel den AP-1 Komponenten c-Fos und c-Jun (Whitmarsh und Davis, 1996; Widmann, *et al.*, 1999).

Neben den oben aufgeführten MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, sind weitere Mitglieder der ERK-Familie identifiziert worden. Eine von ihnen ist die BMK1 (Big mitogen-activated protein kinase), die auch als ERK5 bekannt ist. Es wird berichtet, dass ERK5 durch Wachstumsfaktoren, oxidativen Stress und hyperosmolaren Bedingungen aktiviert werden kann. MEK5, welche von MEKK3 aktiviert wird, ist eine spezifische Kinase „stromaufwärts“ von ERK5. Die Expression eines dominant negativen Form von ERK5 inhibiert die EGF-induzierte Proliferation und verhindern das Eindringen der Zellen in die S-Phase (Kato, *et al.*, 1998). Weitere Proteine der ERK-Familie von Proteinkinasen sind ERK3/4, welche das Microtubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) phosphoryliert, sowie die kürzlich entdeckte ERK7/8 deren

Expression und Aktivität unter anderem durch die DNA-Schadensantwort in der Zelle reguliert wird (Klevernic, *et al.*, 2009).

1.5.2 Der p38 Signalweg

Der p38-Signaltransduktionsweg ist ein weiterer wichtiger MAP-Kinase-Signalweg, dem unter anderem bei der Aktivierung von AP-1 und ATF Transkriptionsfaktoren eine bedeutende Rolle zukommt. Er wird durch zellulären Stress wie UV-Bestrahlung und Hitzeschock, bei hohem osmotischem Stress, durch Lipopolysaccharid, Proteinsynthese-Inhibitoren, Zytokine (wie IL-1 und TNF- α) und bestimmte Mitogene aktiviert. Er spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Apoptose, Differenzierung, Proliferation und der Entwicklung von Zellen, sondern auch bei Entzündungsreaktionen und bei der Stressantwort.

Man kennt vier verschiedene Isoformen von p38 (MAPK14), die als p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ benannt wurden (Ichijo, 1999) und alle von der MAPK-Kinase MKK6 (SKK3) phosphoryliert werden können. Andere MAPK-Kinasen können hingegen nur bestimmte p38 Isoformen phosphorylieren. So aktiviert MKK3 beispielsweise die Isoformen p38 α , p38 γ und p38 δ während MKK4 nur p38 α phosphoryliert. Es wurde gezeigt, dass p38 δ eine notwendige Komponente für den Interferon-Signalweg ist, in welchem diese Kinase die Phosphorylierung und Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂) vermittelt (Kramer, *et al.*, 1996; Borsch-Haubold, *et al.*, 1998; Borsch-Haubold, *et al.*, 1999). Die Aktivierung von p38 durch IFN α oder IFN γ resultiert aber auch in der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Stat1 an Serinrest 727 (Goh, *et al.*, 1999).

Die wohl prominentesten Vertreter von Transkriptionsfaktoren, die durch p38 aktiviert werden können, sind die Faktoren der AP-1 und ATF Familie. So wurde gezeigt, dass p38 den Transkriptionsfaktor ATF-2 phosphorylieren kann. Durch p38 aktivierte ATF-2 Heterdimer-Komplexe binden beispielsweise an Promotoren von MAPK-Phosphatasen wie DUSP-1, DUSP-5, DUSP-8 sowie DUSP-10, welche p38 dephosphorylieren und durch eine Inaktivierung somit das Niveau von aktivem p38 in der Zelle regulieren (Breitwieser, *et al.*, 2007). Der *DUSP1* Promotor wurde als einer von mehreren Promotoren identifiziert, welcher direkt mit ATF-2 und c-Jun interagiert (Hayakawa, *et al.*, 2004). Es wurde aber auch beschrieben, dass bestimmte Isoformen von p38 auch Ziele wie die Mitogen-aktivierten Proteinkinase-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAPK's, -2 und -5) und das damit verwandte Protein MNK1 aktivieren (Ni, *et al.*, 1998; Rane, *et al.*, 2001). Pramanik und Kollegen (Pramanik, *et al.*, 2003) beschreiben für verschiedene p38 Isoformen teilweise gegensätzliche Effekte auf die AP-1-abhängige Transkription durch die Regulation von c-Jun. So verstärkt p38 β beispielsweise die Aktivierung der transkriptionellen AP-1 Aktivität durch MKK6 während p38 γ /p38 δ inhibiert oder keinen Effekt zeigt.

1.5.3 Der JNK Signalweg

Neben ERK und p38 ist die Jun-N-Terminale Kinase (JNK Proteinkinase) die dritte wichtige MAPK. Es gibt insgesamt drei Gene, die für die JNK Proteinkinasen kodieren. Die beiden Kinasen JNK1 und JNK2 werden ubiquitär exprimiert, wohingegen die JNK3 Expression weitgehend auf Gehirn, Herz und Hoden beschränkt ist. Durch alternatives Spleißen der mRNA aller drei Gene lassen sich davon wiederum insgesamt 10 mögliche Isoformen ableiten Gupta, *et al.*, 1996. So gibt es von JNK1 und JNK2 jeweils die Isoformen $\alpha 1$ und $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\beta 2$, sowie von JNK3 die beiden Isoformen $\alpha 1$ und $\alpha 2$. Es wurden verschiedene MAPKKs beschrieben, welche den JNK-Signalweg aktivieren können. Dazu gehören beispielsweise die Mitglieder der MEKK und ASK Gruppe, die MLK Proteinkinase-Gruppe (Mixed Lineage Kinase), Tak-1 und TPL2/Cot (Davis, 2000).

Die Aktivierung von JNK ist verbunden mit der Transformation von Onkogen- und Wachstumsfaktor-vermittelten Signalwegen. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess könnte die Aktivierung von c-Jun spielen. Die JNK Proteinkinasen übertragen Signale, welche für die Differenzierung des hämatopoetischen System wichtig sind und sind möglicherweise an der Embryonalentwicklung beteiligt. Der JNK Signalweg spielt aber auch eine bedeutende Rolle bei der Apoptose und bei Signalwegen, die ein Überleben der Zelle sichern. So beschrieb Tournier, *et al.*, 2000 beispielsweise, dass die UV-induzierte Apoptose in Fibroblasten die Jun-N-Terminale Kinase für die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien erfordert.

Die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK an Serin-63 und Serin-73 führt zu einer Zunahme der Bildung von c-Jun Homodimeren sowie c-Jun/ATF-2 Heterodimeren. Das Heterodimer c-Jun/ATF-2 wirkt sich positiv auf die Expression von Zielgenen mit AP-1 Bindestellen aus. Des Weiteren ist phosphoryliertes c-Jun resistenter gegenüber Ubiquitin-abhängiger Degradation (Nishina, *et al.*, 1997). JNK bindet die NH₂-terminale Aktivierungsdomäne von c-Jun und phosphoryliert dieses Protein an Serin-63 und Serin-73. Die Aktivierung von c-Jun führt zu einer erhöhten Expression von Genen mit AP-1-Bindestellen in ihren Promotoren (AP-1 Zielgene), so zum Beispiel auch dem *JUN* Gen selbst. Dadurch wird eine positive Rückkopplung initiiert. Weitere Substrate, die für JNK identifiziert und beschrieben wurden, sind neben c-Jun beispielsweise ATF-2, Elk-1, Sap-1a, p53 und NFAT4 (Widmann, *et al.*, 1999). Diese Faktoren regulieren beispielsweise den *FOS* Promotor, welches zu einer Aktivierung der Expression des c-Fos Proteins führt und einen weiteren Anstieg von AP-1 zur Folge hat. Der Transkriptionsfaktor p53 wirkt eigentlich negativ auf die Expression von c-Fos, wird aber nach Phosphorylierung durch JNK ubiquitiniert und degradiert. Dadurch wird die Expression von c-Fos positiv beeinflusst. Die JNK-abhängige Phosphorylierung von NFAT4 hemmt dessen Funktion durch die Verhinderung seiner Translokation in den Zellkern. Die Faktoren Elk-1 und Sap-1a binden zusammen mit einem dritten Faktor dem SRF (Serum Response Faktor) als ternärer Komplex an das Serum Response Element (SRE), welches unter Anderem im Promotor des *FOS* Gens vorkommt, und regulieren die Expression seines Genproduktes positiv (Dalton und Treisman, 1992; Price, *et al.*, 1995; Masutani, *et al.*, 1997; Vickers, *et al.*, 2004). JNK phosphoryliert aber auch JunB, JunD, den ETS-verwandten Transkriptionsfaktor PEA3 (O'Hagan, *et al.*, 1996; Ip und Davis, 1998) und Proteine der SMAD Familie.

1.6 Die Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie

Das **Aktivator Protein-1** (AP-1) ist einer der ersten sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren der in Säugetieren entdeckt wurde (Angel, *et al.*, 1987; Bohmann, *et al.*, 1987). Zu Beginn seiner Entdeckung wurde AP-1 bekannt als eine durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate (TPA) induzierbare Transkriptionsfaktorfamilie mit einer als **TPA Response Element** (TRE) bekannt gewordenen Erkennungssequenz, welche in vielen zellulären und viralen Genen gefunden wurde (Angel, *et al.*, 1987). Die Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren gehört zu der Gruppe der bZIP-Proteine, welche sich aus den Mitgliedern der Jun-, Fos- und ATF- (**A**ctivating **T**ranscription **F**actor) Subfamilie von Transkriptionsfaktoren zusammensetzt und durch eine **b**asische **H**elix-**L**oop-**H**elix Region (bHLH) und ein Leuzin-**Z**ipper-Motiv (ZIP) gekennzeichnet sind.

Das charakteristische Merkmal des Leuzin-Zippers ist die periodische Wiederholung von Leuzinen an der Position jeder siebten Aminosäure (Heptadenmuster), wodurch ein hydrophobes Rückgrat entsteht, welches in einer hydrophilen Umgebung dann eine Interaktion über hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen AP-1 Proteinen ermöglicht. Dem ZIP Motiv vorgelagert, befindet sich die positiv geladene basische Region, welche die Bindung an das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA vermittelt (Gentz, *et al.*, 1989; Turner und Tjian, 1989). Sie besteht aus zwei parallelen α -Helices, welche eine linksgängige Super-Helix (Coiled-Coil-Interaktionsdomäne) formen (Landschulz, *et al.*, 1988). Diese DNA-Bindungsdomäne enthält auch die Kernlokalisierungssequenz (NLS), welche identisch ist zwischen v-Jun und c-Jun (Chida und Vogt, 1992).

Die Regulation von AP-1 erfolgt auf verschiedenen Stufen. Die Expression der Proteine dieser Transkriptionsfaktorfamilie ist reguliert durch die Kontrolle der Transkription der jeweiligen Gene und ihre Funktion ist abhängig von der jeweiligen Dimerkomposition als DNA bindender Komplex. Ebenfalls erfolgt die Regulation durch posttranslationale Modifikation der einzelnen Komponenten des AP-1 Komplexes. Die bekannteste posttranslationale Modifikation zur Regulation der Proteinaktivität ist die Phosphorylierung. Diese erfolgt bei AP-1 durch **M**itogen-**a**ktivierte **P**roteinkinasen, den MAPKs (siehe dazu auch **Kapitel 1.5**). Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die Proteindegradation. Hierbei werden die verschiedenen Proteine nach einer Ubiquitinierung dem Abbau durch das Proteasom zugeführt.

Auf die verschiedenen Faktoren, die im AP-1 Komplex zum Teil ganz unterschiedliche Effekte auf die Transkription von Zielgenen ausüben können, wird in den folgenden Kapiteln etwas genauer eingegangen.

1.6.1 Der Transkriptionsfaktor c-Jun aktiviert seine eigene Transkription

Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist einer der am besten charakterisierten AP-1 Komponenten. Er besitzt Fähigkeit zur onkogenen Transformation von Zellen und wurde 1987 ursprünglich als zelluläres Gegenstück des retroviralen Onkogens v-Jun entdeckt und aus dem Vogel-Leukose-Virus 17 (**A**vian **S**arcoma **V**irus **17**) isoliert (Maki, *et al.*, 1987). Nur wenig später wurde dieser Faktor dann als eine der Hauptkomponenten des AP-1 Komplexes identifiziert (Bohmann, *et al.*, 1987). c-Jun ist ein nukleäres

Protein, welches in vielen Zelltypen auf niedrigem Niveau exprimiert wird. Seine Expression wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, UV-Strahlung und extrazellulären Stress verstärkt. Dieses Protein ist zwischen den verschiedenen Spezies relativ konserviert.

Das humane *JUN* ist ein 3,1 kB großes Proto-Onkogen, welches - wie auch viele andere Schnelle-Antwort Gene (immediate-early genes) - keine Introns besitzt (Hattori, *et al.*, 1988). Das 39 kDa Protein, c-Jun, besteht aus 334 Aminosäuren und ist im Wesentlichen in drei Domänen unterteilt. Diese Domänen sind zwischen den verschiedenen Jun und Fos Mitgliedern der AP-1 Familie relativ gut konserviert. Auf die beiden wichtigsten Motive, die **basische Helix-Loop-Helix Region (bHLH)** und das **Leucin-Zipper-Motiv (ZIP)** wurde bereits kurz in **Kapitel 1.6** eingegangen (**Abbildung 5**). Diese C-Terminale Domäne bezeichnet man als bZIP-Motiv.

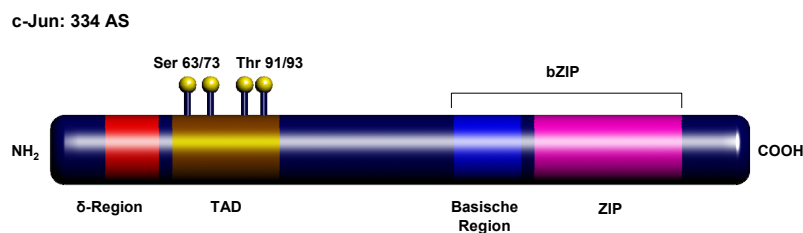


Abbildung 5: Die schematische Darstellung der Struktur von c-Jun:

Die Kinase JNK bindet über die Docking-Region im Bereich der δ -Region und phosphoryliert c-Jun an den Phosphorylierungsstellen Ser63/73 bzw. Thr91/93 in der Transaktivierungsdomäne (TAD). C-Terminal befinden sich die basische Region und die Leucin-Zipper-Domäne, welche zusammen auch als bZIP Motiv bezeichnet wird. Dieses Motiv ist verantwortlich für die DNA-Bindung und die Homo- oder Hetero-Dimerisierung des Proteins.

Innerhalb der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD), befinden sich die MAPK-Phosphorylierungsstellen. So bindet die Proteinkinase JNK beispielsweise über eine Docking-Domäne im Bereich der δ -Region an c-Jun und führt über die Phosphorylierung von Serin 63/73, und unter bestimmten Umständen auch von Threonin 91/93, (Hibi, *et al.*, 1993; Minden, *et al.*, 1994; Smeal, *et al.*, 1994; Vinciguerra, *et al.*, 2008) zu einer Erhöhung des Transaktivierungs-Potentials von c-Jun (Pulverer, *et al.*, 1991; Smeal, *et al.*, 1991). Dies führt wiederum zu einer Stabilisierung, da phosphoryliertes c-Jun Protein in geringerem Ausmaß ubiquitiniert wird (Musti, *et al.*, 1997).

Wie bereits erwähnt ist *JUN* ein Schnelle-Antwort Gen. Seine Aktivierung erfolgt schnell, transient und bedarf keiner Protein *de novo* Synthese. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Umweltstress, bakterielle und virale Infektionen, sowie Onkogene aktivieren die c-Jun Expression. Dabei vermag c-Jun an seinen eigenen Promotor zu binden und seine eigene Expression in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen zu induzieren. Seine Expression, sowohl in proliferierenden, als auch in sich differenzierenden Zellen legt nahe, dass c-Jun eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und Differenzierung spielt (Sng, *et al.*, 2004).

Wie für alle bZIP-Transkriptionsfaktoren, ist die Dimerisierung von c-Jun eine Voraussetzung für seine DNA-Bindung. c-Jun bildet dabei sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit anderen Jun- (**Kapitel 1.6.2** und **1.6.3**), Fos- (**Kapitel 1.6.4**) oder ATF- (**Kapitel 1.6.5**) Proteinen. Die Dimerisierung erfolgt dabei über das Leucin-Zipper-Motiv (Landschulz, *et al.*, 1988; Turner und Tjian, 1989). Smeal und

Kollegen (Smeal, *et al.*, 1989) zeigten, dass Jun-Fos Heterodimere dabei stabiler sind, als Jun-Jun Heterodimere. Es wurde weiterhin gezeigt, dass Jun-Fos Dimere mit der höchsten Affinität an TRE-Sequenzen innerhalb von Promotoren binden und mit etwas geringerer Affinität an CRE-Sequenzen (**cAMP Response Element**), während Jun-ATF Dimere vorzugsweise an das CRE-Element binden (van Dam und Castellazzi, 2001). Der *JUN* Promotor enthält zwei AP-1 Bindungsstellen, von denen eine in die positive Autoregulation des *JUN* Gens durch c-Jun selbst involviert ist (Angel, *et al.*, 1988; Deng und Karin, 1992). Die Induktion der Expression von c-Jun erfolgt in der Regel über diese zwei TRE-ähnlichen Elemente im *JUN* Promotor. Diese werden bevorzugt von c-Jun-ATF-2 Heterodimeren erkannt, welche die basale Expression von c-Jun regulieren. Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus von c-Jun ist, wie bereits oben erwähnt, die Phosphorylierung. Durch diese Proteinmodifikation wird nicht nur die Aktivität und das Transaktivierungspotential dieses Proteins beeinflusst, sondern auch seine Stabilität, seine DNA-Bindungseigenschaften sowie seine Eigenschaft mit anderen Proteinen zu interagieren. Die MAPK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun (Ser63/73 oder Thr91/93) stimuliert dessen Aktivierung (**Abbildung 5**; Hibi, *et al.*, 1993; Minden, *et al.*, 1994; Smeal, *et al.*, 1994; Smeal, *et al.*, 1991; Derijard, *et al.*, 1994). JNK1 wird als die Kinase beschrieben, die c-Jun in stimulierten Fibroblastenzellen aktiviert und stabilisiert, während JNK2 in unstimulierten Zellen verantwortlich ist für die Einleitung der Degradation von c-Jun (Sabapathy, *et al.*, 2004). JNK ist zwar die „dominante“ Kinase hinsichtlich der c-Jun Phosphorylierung, jedoch wurde auch beschrieben, dass die beiden Serinreste 63 und 73 von c-Jun ebenfalls von den MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 in PC12 Zellen (**Phäochromocytom-Zellen/Nebennierentumor**) und in Fibroblasten phosphoryliert werden können (Leppä, *et al.*, 1998; Morton, *et al.*, 2003). Eine weitere, weniger verbreitete Phosphorylierung von c-Jun durch GSK3 an den Threoninresten 231 und 239, sowie den Serinresten 243 und 249 (proximal der DNA-Bindungsdomäne am C-Terminus) wird von Boyle, *et al.*, 1991 beschrieben. Diese Reste werden während der c-Jun Aktivierung dephosphoryliert und repräsentieren inhibitorische Phosphatgruppen (Papavassiliou, *et al.*, 1995). Damit wird für die Aktivierung von c-Jun sowohl die Phosphorylierung der N-terminalen Serinreste in der Transaktivierungsdomäne, als auch die Dephosphorylierung von wenigsten einer der C-terminalen Reste benötigt. Eine Mutation von Serin 243 zu Phenylalanin, führte zu einer bis zu zehnfachen Erhöhung des Transaktivierungspotentials von c-Jun (Boyle, *et al.*, 1991). Die Phosphorylierung von Serin 243 erfolgt auch als Antwort auf die Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), durch eine noch unbekannte Proteinkinase (Morton, *et al.*, 2003).

Neben der Phosphorylierung wird die Funktion von c-Jun *in vivo* auch über Ubiquitinierung und Sumoylierung reguliert. Die K48-Ubiquitinierung markiert Proteine gewöhnlich für den proteasomalen Abbau, während die Sumoylierung die subzelluläre Lokalisierung und Stabilität von Proteinen regulieren kann, und damit die Transkriptionsaktivierung oder DNA-Bindungsfähigkeiten von Transkriptionsfaktoren beeinflusst. JNK2 bindet an die δ -Region (**Kapitel 1.5**) von c-Jun in normal wachsenden, unstimulierten Zellen und markiert dieses Protein durch Phosphorylierung für dessen Ubiquitinierung und die anschließende Degradation. Nach Stimulation der Zellen erfolgt die MAPK-

vermittelte Phosphorylierung von c-Jun, gefolgt von einer Verringerung der Ubiquitinierung von c-Jun und es kommt dadurch zu einer Stabilisierung des Proteins (Treier, *et al.*, 1994; Fuchs, *et al.*, 1996; Musti, *et al.*, 1997). SUMO-1 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, welches Proteine analog zum Ubiquitin-Proteasom-Weg markiert. Trotz seiner Homologie und ähnlicher Funktionen führt die Sumoylierung von Zielproteinen nicht zu deren Abbau. Die Sumoylierung von c-Jun resultiert dabei in einer Abnahme seiner transkriptionellen Aktivität (Cheng, *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu I κ B α , in dem die Rolle von Ubiquitinierung und Sumoylierung gegensätzlich ist (Kompetition an Lysin 21), wirkt die Sumoylierung von c-Jun nicht seiner Ubiquitinierung entgegen (Desterro, *et al.*, 1998; Muller, *et al.*, 2000). Die Sumoylierungsstelle in c-Jun wurde im C-Terminus als Lysin 229 identifiziert, während für die Ubiquitinierung insgesamt 17 mögliche Lysine in c-Jun identifiziert wurden, wobei die N-Terminal lokalisierten Lysine den Hauptanteil an der Ubiquitinierung des Proteins haben (Treier, *et al.*, 1994). Die Sumoylierung ist ein reversibler Prozess, und die Desumoylierung wird durch SUMO-spezifische Proteasen (SENPs) vermittelt. So können zum Beispiel die beiden Proteasen SENP1 und SENP2 die transkriptionelle Aktivität von c-Jun positiv regulieren (Cheng, *et al.*, 2005). Eine Isoform von SENP2, SuPr-1, wurde als ein zusätzlicher Transkriptionsaktivator von c-Jun identifiziert, welcher unabhängig von der Phosphorylierung von c-Jun agiert. SuPr-1 beeinflusst die c-Jun-Aktivität indirekt, wahrscheinlich durch eine Verschiebung der Lokalisierung von anderen Koaktivatoren und/oder Repressoren (Best, *et al.*, 2002).

1.6.2 Die Transkription von JunB wird durch NF- κ B reguliert

Ryder und Mitarbeiter zeigte durch die Klonierung von *JUNB*, dass es eine Familie von *JUN*-ähnlichen Genen gibt (Ryder, *et al.*, 1988). Ähnlich wie c-Jun, spielt JunB eine Rolle bei der Genregulation in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren. JunB hat eine sehr ähnliche Primärstruktur und DNA-Bindungsspezifität wie c-Jun, mit Ausnahme seiner Transaktivierungsdomäne. Diesem Protein fehlen die N-Terminalen Serinreste, 63 und 73, welche eine wichtige Rolle bei der MAPK-abhängigen Phosphorylierung von c-Jun spielen. Jedoch werden die Threoninreste 102 und 104 von JunB durch JNK phosphoryliert und entsprechen den Threoninen 91 und 93 im c-Jun Protein (Kallunki, *et al.*, 1996; Li, *et al.*, 1999). Die Expression von JunB wird nicht nur durch Faktoren der AP-1- und ATF-Familie, sondern auch durch einen NF- κ B-abhängigen Prozess reguliert, welches unter anderem durch die Verwendung des Superrepressors I κ B α Δ N gezeigt wurde (Mathas, *et al.*, 2002; Krappmann, *et al.*, 2004). Die beiden Proteine c-Jun und JunB unterscheiden sich sehr stark in ihrer Fähigkeit die Transkription zu aktivieren. Während c-Jun ein effizienter Aktivator seines eigenen Promotors ist, zeigt sich für JunB eher ein gegenteiliger Effekt. JunB besitzt allgemein die Eigenschaft, die Aktivierung von Promotoren mit AP-1 Bindestellen zu inhibieren. Es wurde allerdings auch beschrieben, dass JunB einen aktivierenden Effekt auf diese Promotoren haben kann, sofern diese mehrere AP-1 Erkennungssequenzen, beziehungsweise Bindemotive, enthalten (Chiu, *et al.*, 1989). Eine Sumoylierung von JunB in T-Zellen resultiert ebenfalls in der transkriptionellen Aktivierung AP-1-abhängiger Gene, obwohl diese Modifizierung allgemein zu einer transkriptionellen Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren führt (Garaude, *et al.*, 2008). Es wurde

auch gezeigt, das c-Jun und JunB antagonistische Funktionen bei der Kontrolle der Zelltransformation, Differenzierung und der Expression AP-1-abhängiger Zielgene haben. Durch die gleichzeitige Expression von JunB und c-Ha-ras (GTPase HRas; Transforming Protein p21) in embryonalen Fibroblasten der Ratte kann eine Transformation induziert werden, die allerdings deutlich geringer ist, als die bei gleichzeitiger Expression von c-Jun und HRas beobachtete Wirkung. Werden c-Jun und JunB kotransfiziert, dann wird die Ras-induzierte Transformation deutlich inhibiert, verglichen mit dem Effekt von c-Jun alleine (Schutte, *et al.*, 1989).

Watanabe und Kollegen berichten über eine Beteiligung von JunB an der Überexpression von CD30 (Ki-1, TNFRSF8) (Watanabe, *et al.*, 2005). Dieser Aktivierungsmarker wird in der Mehrzahl der Fälle in Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen exprimiert und ist ein Beispiel für die Liganden-unabhängige Signaltransduktion die zur Aktivierung von NF- κ B führt (Stein, *et al.*, 1985; Nonaka, *et al.*, 2005).

1.6.3 Der Transkriptionsfaktor JunD

Kurz nach der Entdeckung des *JUNB*-Gens durch Ryder, *et al.*, 1988 wurde von der gleichen Gruppe das dritte Mitglied der Jun-Familie von Transkriptionsfaktoren, *JUND*, kloniert (Ryder, *et al.*, 1989). Das JunD Protein hat eine ähnliche Primärstruktur, DNA-Bindungseigenschaften und Phosphorylierungsstellen wie c-Jun und seine Expression ist ubiquitär (Hirai, *et al.*, 1989; Ryder, *et al.*, 1989). Alternative Translationsstartpunkte im *JUND*-Gen resultieren in der Synthese verschiedener Isoformen.

Hinsichtlich ihrer Funktion bei der Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation wurden für c-Jun und JunD gegensätzliche Rollen vorgeschlagen. Allerdings kann JunD, in Abhängigkeit vom zellulären Kontext, den Ablauf des Zellzyklus nicht nur positiv, sondern auch negativ beeinflussen (Weitzman, *et al.*, 2000; Meixner, *et al.*, 2004). Die Überexpression von JunD in immortalisierten Fibroblasten verringert deren Proliferation (Pfarr, *et al.*, 1994). Darüber hinaus zeigen immortalisierte JunD^{-/-} Fibroblasten eine bessere Proliferation durch eine erhöhte Cyclin D1 Expression (Weitzman, *et al.*, 2000). Allerdings zeigt JunD auch positive Effekte auf den Zellzyklus. Primäre Maus-Fibroblasten, denen JunD fehlt, proliferieren weniger und zeigen eine vorzeitige Seneszenz in Abhängigkeit von einem p53-abhängigen Signalweg (Weitzman, *et al.*, 2000). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem der immortalisierten JunD^{-/-} Fibroblasten. JunD spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der zellulären Transformation *in vitro*. So ist die Expression von JunD in Ras-transformierten Fibroblasten verringert und eine Überexpression von JunD unterdrückt teilweise die Ras-induzierte Transformation (Pfarr, *et al.*, 1994). Auf der anderen Seite wurde beschrieben, dass der Tumor-Suppressor Menin mit JunD interagieren kann und damit seine transkriptionelle Aktivität unterdrückt, was darauf hindeutet, dass eine Herunterregulation von JunD mit der Unterdrückung von neoplastischem Wachstum einhergeht (Agarwal, *et al.*, 1999). JunD wurde auch als ein antiapoptotischer Faktor identifiziert. So zeigen JunD-defiziente Fibroblasten beispielsweise eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Bestrahlung oder TNF α -Behandlung (Weitzman, *et al.*, 2000). Damit könnte die Akkumulation von p53 im Kern von JunD^{-/-} Fibroblasten der Grund für die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber proapoptotischen Signalen

sein. Darüber hinaus zeigten Mäuse, denen JunD fehlte, eine erhöhte Empfindlichkeit auf die zytotoxische Wirkung einer TNF α -vermittelten Hepatitis *in vivo* (Weitzman, *et al.*, 2000). Lamb und Kollegen zeigten, dass ein Zusammenspiel von NF- κ B mit dem JNK/JunD Signalweg zu einer Zunahme der Expression des antiapoptotischen Gens *c-IAP-2* führt, dessen Promotor sowohl NF- κ B- als auch AP-1-Bindestellen besitzt (Lamb, *et al.*, 2003).

1.6.4 Die Transkriptionsfaktoren der Fos-Familie

Eine weitere Subfamilie des Transkriptionsfaktors AP-1 ist die Fos Familie von Transkriptionsfaktoren, zu denen das Protein c-Fos gehört, aber auch die Proteine Fra1 und Fra2, sowie die beiden alternativ gespleißten Isoformen FosB und Δ FosB. Der strukturelle Aufbau dieser Proteine ist dem der Jun-Proteine sehr ähnlich. Durch die Beeinflussung der Transkription von Zielgenen werden nicht nur wichtige Prozesse auf Zellebene, sondern auch zellübergreifende Funktionen im gesamten Organismus reguliert. So sind Fos-Proteine involviert in die Kontrolle der Proliferation, regulieren die Differenzierung und Apoptose von Zellen, kontrollieren die zelluläre Stressantwort und spielen außerdem eine wichtige Rolle in der Organogenese und bei Immunreaktionen. Die Transkription von c-Fos wird als Antwort auf viele extrazelluläre Signale hochreguliert, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Phorbol ester und UV-Licht. Darüber hinaus wird die Aktivität und Stabilität von c-Fos durch Phosphorylierung - vermittelt durch MAPK, PKA, PKC oder cdc2 - verändert. Die Mitglieder der Fos-Familie dimerisieren mit c-Jun unter Bildung des AP-1 Transkriptionsfaktors, der die Transkription einer Vielfalt von Genen hochreguliert, die, wie bereits oben erwähnt, bei der Kontrolle der Proliferation und Differenzierung der Zelle eine Rolle spielen, die aber auch an der Abwehr der Zelle gegen Invasion und der Reparatur von Zellschäden beteiligt sind. Die Transkriptionsfaktoren der Fos-Familie bilden keine Homodimere sondern ausschließlich Heterodimere mit Mitgliedern der Jun-Familie und der ATF/CREB-Familie.

1.6.5 Die Transkriptionsfaktoren der ATF/CREB-Familie

Neben der Jun und Fos Familie von AP-1 Faktoren existiert noch eine dritte wichtige Unterfamilie, die Transkriptionsfaktoren der ATF/CREB-Familie (Activating Transcription Factor/ cAMP Response Element-Binding). Die Faktoren dieser Familie binden an die DNA Sequenz 5'-TGANNTCA-3', welche auch als CRE-Element (cAMP response element) bekannt ist (Hai und Hartman, 2001). Jun-Jun-Dimere und Jun-Fos-Dimere können neben der Bindung von klassischen AP-1-DNA-Bindemotiven, auch eine Bindung mit ATF/CREB-Motiven, abhängig von den flankierenden Sequenzen auf der DNA, eingehen. Heute definiert man die ATF- und CREB-Proteine als eine eigene Unterfamilie von AP-1. Die ATF/CREB Familienmitglieder können auf Grundlage ihrer Partnerspezifität in zwei verschiedene Unterklassen geteilt werden. Die Mitglieder der ersten Unterklasse, hierbei handelt es sich um CREB und ATF-1, bilden entweder Homodimere oder CREB-ATF-1 Heterodimere, zeigen aber keine Wechselwirkung mit anderen ATF-Proteinen. Die Mitglieder der zweiten Unterklasse, ATF-2, ATF α , CREBP-2, ATF-3, ATF-4 und ATF-6 interagieren sowohl mit sich selbst und mit spezifischen Jun

und/oder Fos Familienmitglieder. So bildet c-Jun stabile Dimere mit ATF-2, ATF-3 und ATF-4, nicht aber mit ATF-1 und CREB. Stabile Heterodimere können c-Fos und Fra-1 mit ATF-4 bilden, nicht jedoch mit ATF-2 und ATF-3 (Benbrook und Jones, 1990; Ivashkiv, *et al.*, 1990; Hai und Curran, 1991; Chatton, *et al.*, 1994). Sowohl ATF-2 Homodimere als auch c-Jun-ATF-2 Heterodimere binden mit hoher Affinität an degenerierte ATF-Bindesequenzen mit dem Konsensus Motiv „T[G/T]ACNTCA“ (van Dam und Castellazzi, 2001).

Jun, Fos und ATF Familienmitglieder können ebenfalls an DNA binden in Assoziation mit Mitgliedern der Transkriptionsfaktorfamilie von **Maf**-Proteinen (**m**usculo**a**poneurotic **f**ibrosarcoma, Kerppola und Curran, 1994; Motohashi, *et al.*, 1997), mit **C/EBP** (**C**CAAT/**e**nhancer **b**inding **p**rotein, Kageyama, *et al.*, 1991), und mit Mitgliedern welche nicht den bZIP Faktoren angehören, wie zum Beispiel NF- κ B (Stein, *et al.*, 1993), **NFAT** (**n**uclear **f**actor of **a**ctivated **T**-cells, Jain, *et al.*, 1993; Chen, *et al.*, 1998), und Smad (**m**others **a**gainst **d**ecapentaplegic (MAD), Liberati, *et al.*, 1999). Damit können AP-1 Komponenten auch an regulatorische Elemente in Promotoren rekrutiert werden, die keine Ähnlichkeit mit dem AP-1-Konsensus-Motiv aufweisen.

Ein strukturelles Merkmal, welches sich alle Proteine der ATF/CREB-Familie teilen, ist ihre bZIP Domäne. Einige Proteine dieser Familie weisen aber noch zusätzliche Ähnlichkeiten in anderen Regionen auf. So zeigen beispielsweise ATF-1 und CREB eine bis zu 75%-ige Ähnlichkeit in der Abfolge ihrer Aminosäuresequenz. Die N-Terminalen Domänen der anderen ATF Proteine weichen jedoch recht stark voneinander ab. So besitzt der Transkriptionsfaktor ATF-2, welcher ubiquitär exprimiert wird, neben seinem C-terminalen bZIP-Motiv eine N-Terminale Transaktivierungsdomäne (TAD). Im nicht aktiven Zustand interagiert die bZIP Domäne intramolekular mit der TAD und inhibiert so die transaktivierende Eigenschaft von ATF-2 (Li und Green, 1996). Die Aktivität von ATF-3 hingegen kann unter anderem, zelltypspezifisch, über die Expression verschiedener Isoformen reguliert werden. Diese alternativ gespleißten Isoformen von ATF-3 sind beispielsweise die von Chen, *et al.*, 1994 und Hashimoto, *et al.*, 2002 beschriebenen ATF-3- Δ Zip Varianten. Durch das Fehlen der Leucin-Zipper-Domäne kann das Protein nicht mehr an das ATF/CRE Motiv binden. Diese ATF-3- Δ Zip Varianten können die Transkription stimulieren, weil sie inhibitorische Faktoren binden und vom Promotor fernhalten.

1.7 Die kooperative Wirkung von NF- κ B und AP-1 im Hodgkin Lymphom

Wie bereits in **Kapitel 1.2** beschrieben wurde, sind nicht nur die konstitutive NF- κ B Aktivität sondern auch eine konstitutive AP-1 Aktivität eines der auffälligsten molekularen Merkmale der Zellen des Hodgkin-Lymphoms. In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Signalwege, die zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führen, etwas genauer betrachtet. In den Zellen des Hodgkin Lymphoms beobachtet man neben einer persistenten Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges über den IKK-Komplex auch eine anhaltende Prozessierung von p100 zu p52 (Nonaka, *et al.*, 2005). Die Abhängigkeit der p100-Prozessierung von NIK und IKK α wurde von Xiao *et al.* für NIK in HEK-293-Zellen und von Senftleben *et al.* für IKK α in murinen B-Zellen gezeigt (Senftleben, *et al.*, 2001; Xiao, *et al.*, 2001). Die

Hauptursache, die zur Aktivierung von NF- κ B führt, ist auch nach vielen Jahren intensiver Forschung noch immer nicht geklärt. So beobachtet man zwar in allen Hodgkinzellen eine konstitutive Aktivierung der IKK's, jedoch ist die Ursache für diese Aktivierung noch unbekannt. In einigen Fällen werden auch Mutationen oder verkürzte Formen von I κ B's für eine anhaltende NF- κ B Aktivität im Kern verantwortlich gemacht. So zeigen die Hodgkin-Zelllinien L428 und KMH-2 beispielsweise verkürzte mutierte Formen des in den Hodgkinzellen überexprimierten I κ B α Proteins (Wood, *et al.*, 1998; Cabannes, *et al.*, 1999; Emmerich, *et al.*, 1999; Krappmann, *et al.*, 1999; Jungnickel, *et al.*, 2000). Diese mutierten I κ B α -Proteine können keine NF- κ B-Dimere im Zytoplasma zurückhalten. Möglicherweise übernimmt hier eines der anderen I κ B-Proteine diese Funktion (Hinz, *et al.*, 2012). Die Hodgkinzellen sind auch dafür bekannt, dass sie eine Reihe inflammatorischer Zytokine produzieren. Dazu zählen unter anderem solche, die potentiell dazu in der Lage sind NF- κ B zu aktivieren, oder deren Transkription durch NF- κ B reguliert wird (Hsu und Hsu, 1989; Xerri, *et al.*, 1992; Foss, *et al.*, 1993; Wolf, *et al.*, 1996). Dies konnte gezeigt werden, indem Kulturüberstände von Hodgkinzellen mit anderen Zellen, wie zum Beispiel REH Zellen oder Namalwa, inkubiert wurden. Diese Zellen zeigten eine schnelle und transiente Aktivierung von NF- κ B. Ein weiterer interessanter Befund ist, dass sich die Aktivierung von NF- κ B durch verschiedene zelluläre Stimuli, wie zum Beispiel TNF α oder PMA, in den Hodgkinzellen nicht weiter erhöhen lässt, da sie bereits ihren maximalen Wert erreicht hat (Krappmann, *et al.*, 1999).

Über die Ursachen der aberranten AP-1 Aktivität in den Hodgkinzellen ist derzeit noch recht wenig bekannt. Mathas und Kollegen (Mathas, *et al.*, 2002) fanden, sowohl persistent aktiviertes AP-1, als auch eine Überexpression von c-Jun und JunB in den Tumorzellen von Patienten mit klassischem Hodgkin-Lymphom. Eine ähnliche AP-1 Aktivierung findet man außerdem nur noch im Anaplastischen Großzelligen Non-Hodgkin-Lymphom (ALC-Lymphom, ALCL), aber nicht in anderen Lymphom-Typen. Während die Expression von c-Jun durch einen autoregulatorischen Prozess hochreguliert wird, steht die Expression von JunB unter der Kontrolle von NF- κ B (Brown, *et al.*, 1995). Ein weiteres Protein der AP-1 Familie, der Transkriptionsfaktor ATF-3 wird von Janz und Kollegen als Hodgkin-spezifischer Marker beschrieben (Janz, *et al.*, 2006). Ryseck und Kollegen untersuchten die DNA-Bindeaffinitäten für die verschiedenen Jun-Mitglieder der AP-1 Familie und fanden heraus, dass c-Jun die höchste Affinität besitzt, gefolgt von JunD und dann von JunB (Ryseck und Bravo, 1991). Diese binden ebenfalls mit sehr hoher Affinität an CRE-Sequenzen. Interessant ist außerdem, dass die Affinitäten von c-Jun, JunB und JunD für identische Bindemotive unterschiedlich sein können, wenn sich diese Motive in ihren flankierenden DNA-Sequenzen unterscheiden. Möglicherweise sind die flankierenden Sequenzen wichtig für die Stabilität des DNA-Protein-Komplexes (Ryseck und Bravo, 1991).

Die starke anhaltende AP-1 Aktivität in den Zellen des Hodgkin Lymphoms sollte vermuten lassen, dass die MAP-Kinasen, die zur Aktivierung von AP-1 führen ebenfalls eine hohe Aktivität aufweisen, jedoch konnte gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist (Mathas, *et al.*, 2002). Es wurde weder eine verstärkte Phosphorylierung der MAP-Kinasen noch der terminalen Transkriptionsfaktoren dieser Signalwege nachgewiesen. Dennoch weisen die Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen eine erhöhte AP-1 Aktivität und eine verstärkte AP-1 Expression auf. Anders als bei der konstitutiven NF- κ B Aktivität in den

Hodgkinzellen, welche bereits maximal ist und damit nicht mehr induzierbar, ist es bei der AP-1 Aktivität sehr wohl möglich diese, beispielsweise durch PMA oder UV-Licht, zu induzieren (Mathas, *et al.*, 2002). Dieser Befund belegt, dass die verschiedenen Signalkaskaden, die zur Aktivierung von AP-1 führen allgemein funktionsfähig sind und durch einen anderen, möglicherweise NF- κ B-abhängigen Prozess, welcher eine Inaktivierung von MAP-Kinasen bewirkt, inhibiert wird. So wird beispielsweise die Expression einiger **MAP-Kinase-Phosphatasen (MKP)**, wie zum Beispiel MKP-1, MKP-7 oder PAC-1, durch NF- κ B kontrolliert (Guo, *et al.*, 1998; Krappmann, *et al.*, 2004; Chang, *et al.*, 2006; Wang, *et al.*, 2008). Aber auch Inhibitoren der JNK-Aktivierung, wie **XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)** und **GADD45 β (Growth Arrest and DNA Damage)** sind Zielgene von NF- κ B (De Smaele, *et al.*, 2001; Karin und Lin, 2002; Bubici, *et al.*, 2004). XIAP bindet und inhibiert aber auch die Caspasen 3, 7 und 9. Die BIR2 Domäne von XIAP inhibiert dabei die Caspasen 3 und 7, während die BIR3 Domäne an Caspase 9 bindet und diese inhibiert (Kashkar, *et al.*, 2003). Damit könnte das in Hodgkinzellen überexprimierte XIAP nicht nur die proapoptotische Funktion von JNK blockieren sondern auch die für die Apoptose wichtige Caspase-Kaskade und damit zum Überleben der Zellen beitragen. Wie an diesen Beispielen gezeigt wurde, beeinflussen NF- κ B Zielgene nicht nur die Apoptose, sondern über verschiedene Mechanismen auch Signalwege, die zur Aktivierung von AP-1 führen. Aber AP-1 und NF- κ B kooperieren auch bei der Expression von Zielgenen. So ko-stimulieren sie beispielsweise die Expression des Zellzyklus-Regulators Cyclin D2, des Proto-Onkogen-Produktes c-Met und des Lymphozyten-Homing Rezeptors CCR7, welche alle stark in primären Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen exprimiert werden (Mathas, *et al.*, 2002).

Eines der wenigen Beispiele, in denen AP-1 auch NF- κ B beeinflusst, ist die in **Kapitel 1.6.2** erwähnte Beteiligung von JunB an der Expression von CD30 (Watanabe, *et al.*, 2005). Die erhöhte Expression von CD30 führt wiederum zu einer Induktion der NF- κ B Aktivität. Jedoch muss an dieser Stelle noch einmal erwähnt werden, dass auch die Expression von JunB ein NF- κ B-abhängiger Prozess ist (Brown, *et al.*, 1995) und CD30 damit indirekt auch über NF- κ B hochreguliert wird. Mineva und Kollegen beschreiben eine synergistische Beteiligung von AP-1 und p50/c-Rel bei der Regulation des *RELB* Promotors in WEHI 231 Zellen als Antwort auf die Stimulation mit dem CD40-Liganden CD154 (Mineva, *et al.*, 2007). Der in diesen Zellen induzierte AP-1 Komplex enthielt die Komponenten c-Jun, JunB, JunD und Fra-2. Fra-2 ist jedoch nicht Bestandteil der konstitutiven AP-1 Aktivität in den Hodgkinzellen. Ebenso ist interessant, dass auch die anderen Proteine der Fos-Familie bei der konstitutiven AP-1 Aktivität in den Hodgkinzellen weitgehend keine Rolle spielen, sondern eher in der induzierten AP-1 Aktivität stimuliert durch beispielsweise PMA oder UV-Licht (Mathas, *et al.*, 2002).

Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist neben JunB ein weiterer Faktor der AP-1 Familie, der in den Hodgkinzellen stark überexprimiert wird. Eine Abhängigkeit der c-Jun Expression von NF- κ B wurde bisher nicht nachgewiesen. Dennoch stellt sich die Frage, wie es zu einer so starken Expression von c-Jun in den Hodgkinzellen kommt, obwohl die Signalkaskaden, die zur Aktivierung von AP-1 führen, nicht aktiviert sind. Eine Stabilisierung von c-Jun durch eine JNK2 Phosphorylierung, welche wiederum zu

verringerten Ubiquitinierung und zum verringerten Abbau von c-Jun führt, ist daher auszuschließen (siehe **Kapitel 1.6.1**).

Mathas und Kollegen zeigten, dass c-Jun ein eher labiles Protein ist, dessen Halbwertszeit in Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen, ähnlich wie auch bei anderen Zelltypen, bei etwa 120 bis 170 Minuten liegt (Lamph, *et al.*, 1988; Mathas, *et al.*, 2002). Die Halbwertszeit der mRNA liegt bei etwa 40 Minuten (Mathas, *et al.*, 2002). Damit kann die drastische Akkumulation von c-Jun in den Hodgkinzellen weder durch eine erhöhte Proteinstabilität noch durch eine erhöhte mRNA-Stabilität erklärt werden. Eine der Kernfragen in Bezug auf die konstitutive AP-1 Aktivität in Hodgkinzellen ist die Frage nach der Ursache für die starke Anreicherung von c-Jun und welche Faktoren möglicherweise an diesem Prozess beteiligt sind.

1.8 Zielstellung

Ein besonderes Kennzeichen der Zellen des Hodgkin-Lymphoms ist neben der persistenten Aktivierung des NF- κ B Signalweges, eine konstitutive AP-1 Aktivität, die sich durch eine Überexpression von c-Jun und JunB darstellt. Während die starke Expression von JunB ihre Ursache unter anderem in der konstitutiven NF- κ B Aktivität hat, ist die Ursache für die Überexpression von c-Jun eine der Kernfragen dieser Arbeit, da die oberhalb von c-Jun gelegene MAP-Kinase-Kaskade inaktiv ist und daher nicht für eine Induktion der c-Jun Expression verantwortlich sein kann. Möglicherweise interagieren in Hodgkinzellen weitere Faktoren mit dem *JUN* Promotor und tragen damit zu der verstärkten c-Jun Expression bei.

Die Zielsetzung der hier vorliegenden Doktorarbeit ist es, neben bereits bekannten Faktoren, mögliche zusätzliche Faktoren, die mit dem *JUN* Promotor in Zellen des Hodgkin Lymphoms assoziiert sind, über verschiedene chromatographische Reinigungsschritte anzureichern, mittels Massenspektrometrie zu identifizieren und hinsichtlich ihres Einflusses auf die c-Jun Expression zu analysieren. Es sollen mögliche Interaktionen zwischen dem NF- κ B- und dem AP-1-System aufgedeckt werden. Die Befunde dieser Arbeit sollen zu einem besseren Verständnis der Regulation der AP-1 Aktivität in Hodgkinzellen beitragen.

2 Material

2.1 Geräte und Zubehör

- 80°C Tiefkühlschränke	Forma Scientific
Blot-Kammer mit Zubehör	Fa. Biorad
Brutschränke	Memmert
CO ₂ Inkubator	Binder
Dialysefilter	Millipore
Drehrad	Herolab
Elektroporationsgerät	Biorad Genepulser II
Elektroporationsküvetten	Biorad
Feinwaagen	Sartorius BP 310S
	Sartorius MCBA 100
Geltrockner	Savant stacked gel dryer SGD 300
Heizblöcke	Techne DB3, Eppendorf Thermomixer 5436
Kühlzentrifugen	Eppendorf 5417R
	Eppendorf 5402
Kunststoffküvetten	Sarstedt
Luciferasemessgerät	Mithras LB 940 (Berthold Technologies)
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop	Zeiss TELAVAL 31
Mikrowelle	Privileg 9029GD
N ₂ -Behälter	CRONOS, Messer Griesheim
Petrischalen	Greiner
pH-Meter	Knick
Photometer	Novaspec II und GeneQuant II (Pharmacia Biotech)
	NanoDrop-1000-Spektrophotometer „ND-1000“ (PEQLab)
Proteingelkammern	Biorad Mini Protean ® II Cell
PVDF-Membran	Millipore
Semi-Dry Blot	PHASE, Lübeck
Sequenzierautomaten	Applied Biosystems 310
Spannungsquellen	Biorad Model 200/2.0 Power Supply
	Electrophoresis Power Supply EPS3500
Sterilbank	BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Szintillationszähler	TRICARB 1900 TR Liquid Scintillation Counter (Packard)
Thermocycler	Biometra Trio
Thermomixer	Eppendorf 5436
Tischzentrifugen	Eppendorf 5415C
	Eppendorf 5416
Transilluminator	Darkreader
Ultrazentrifuge	Optima MAX-XP
Vortex	Jahnke & Kunkel
Warmluftschüttler	Infors HT
Wasserbäder	Haake F3
Whatman Rundfilter (85/125 mm)	Whatman
Zellkulturschalen	Greiner
Zentrifugen	Beckmann Avanti J-25
	Beckmann J6-HC

2.2 Chemikalien

[³² P]-dATP	NEN
[³² P]-γ-ATP	NEN
β-Glyzerophosphat	Sigma, München
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	GibcoBRL, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, USA
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, USA
Bacto-Tryptone	Difco, USA
Blastizidin (10 mg/ml)	Invitrogen, Darmstadt
Bradford Reagenz	Biorad, USA
Bromphenolblau	Biorad, USA
Chemikalien allgemein	Merck, Darmstadt
Difco Peptone	Difco, USA
Difco yeast nitrogen base w/o amino acids	Difco, USA
N, N-dimethylformamide	Sigma, München
DMEM	GibcoBRL, USA
DMSO	Sigma, München
DNA-Marker, 1 kb+	GibcoBRL, USA
dNTPs	Pharmacia, Schweden
DTT	Sigma, München
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Fötales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, USA
Geneticin (G418)	GibcoBRL, USA
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia, Schweden
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Calbiochem, USA
Hi-Di-Formamid	Applied Biosystems, Weiterstadt
Isopropyl-β-D-galactosid (IPTG)	GibcoBRL, USA
Leupeptin	Sigma, München
L-Glutamin	GibcoBRL, USA
Lithiumacetat	Sigma, München
Lösungsmittel allgemein	Roth, Karlsruhe
M-MEM	ICN, USA
Na-Fluorid	Sigma, München
Na-Pyruvat	GibcoBRL, USA
Na-Vanadat	Sigma, München
NP-40	Fluka, Neu-Ulm
4α-Phorbol 12-myristate 13-acetate	Alexis, USA
Pefabloc	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Seromed, Berlin
Pepstatin A	Sigma, München
poly dIdC	Roche, Mannheim
Proteinmolekulargewichtsmarker	Fermentas, St. Leon-Rot - Deutschland
Protein-A-Sepharose CL-4B	Pharmacia, Schweden
Protein-G-Sepharose	Pharmacia, Schweden
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt
Röntgenfilmentwickler	Sigma, München
Röntgenfilmfixierer	Sigma, München
RPMI 1640	GibcoBRL, USA
Select agar	GibcoBRL, USA

TEMED	Biorad, USA
TNF α	Biomol, Hamburg
Tris / HCL	Sigma, München
Trypanblau	Sigma, München
Trypsin/EDTA	Seromed, Berlin
Tween 20	Sigma, München
Xylencyanol FF	Biorad, USA
Zeocin (100 mg/ml)	Invitrogen, Darmstadt

2.3 Enzyme und Kits

AmpliTaq-DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v2.0	Applied Biosystems, Weiterstadt
BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit	Invitrogen, Darmstadt
DeepVent-DNA-Polymerase	BioLabs, UK
Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega, Madison, USA
Klenow-Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	GibcoBRL, USA
	Amersham, UK
	BioLabs, UK
	NEB, UK
RNase A	Roche, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	BioLabs, UK
T4-DNA Ligase	BioLabs, UK
	Amersham, UK
Phototype-HPR Western Detection System	BioLabs, UK
QIAGEN Maxipräparation	QIAGEN, Hilden
Qiaquick gel extraction kit	QIAGEN, Hilden
Qiaquick nucleotide removal kit	QIAGEN, Hilden
Qiaquick PCR purification kit	QIAGEN, Hilden
Western-Light Plus™ Chemiluminescent detection system	Serva, Heidelberg

2.4 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> (π 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (Gibco, USA)
<i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysS	F ⁻ , <i>hsdS</i> , <i>gal</i> , <i>ompT</i> , r _B ⁻ , m _B ⁻ (Novagen/Merck, Darmstadt)
<i>E.coli</i> One SHOT [®] TOP10 (Chemisch Kompetente Zellen)	<i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Invitrogen, Darmstadt)

2.5 Zelllinien

<u>Standardzelllinien (Medium: DMEM):</u>		<u>DSMZ-Nr.:</u>
HeLa	Humane Epithelzelllinie aus Zervixkarzinom	ACC 57
HEK-293	Humane Epithelzelllinie aus Nierengewebe	ACC 305
<u>Hodgkin Lymphom abgeleiteten Zelllinien (Medium: RPMI-1640):</u>		<u>DSMZ-Nr.:</u>
HDLM-2	humane Hodgkin Lymphom Zelllinie	ACC 17
KMH-2	humane Hodgkin Lymphom Zelllinie	ACC 8
L428	humane Hodgkin Lymphom Zelllinie	ACC 197
L540	humane Hodgkin Lymphom Zelllinie	ACC 72
L591	humane lymphoblastoide B-Zelle	ACC 602
L1236	humane Hodgkin Lymphom Zelllinie	ACC 530
<u>Referenzzelllinien (Medium: RPMI-1640):</u>		<u>DSMZ-Nr.:</u>
Namalwa	humane Burkitt Lymphom Zelllinie	ACC 24
BJAB	humane Burkitt Lymphom Zelllinie	ACC 72
Raji	humane Burkitt Lymphom Zelllinie	ACC 319
Ramos	humane Burkitt Lymphom Zelllinie	ACC 603
Reh	humane leukämische Vorläufer-B-Zelle	ACC 22
BL-60	humane Burkitt Lymphom Zelllinie	
BL-99	humane Burkitt Lymphom Zelllinie	

2.6 Plasmide

Die im Verlauf dieser Arbeit erstellten eukaryotischen Konstrukte wurden in das Reporterkonstrukt pGL2-Basic (Promega) kloniert. Diesem Konstrukt fehlt die eukaryotische Promotorregion. Durch Ligation der Promotorfragmente in die Restriktionsschnittstellen *KpnI/HindIII* wurden geeignete regulatorische Sequenzen vor das Gen der Firefly-Luciferase inseriert, die es ermöglichten, die Regulation des *JUN* Gens auf Stimulatoren oder in Abhängigkeit von der Expression anderer Proteine zu studieren. Die Fragmente, die in diesen Vektor kloniert wurden, entstanden durch PCR vorhandener Plasmide.

Konstrukt	Beschreibung
pGL2-c-JunPro WTK	Kurzer WT-Pomotor des <i>JUN</i> Gens (Bereich -283-+171).
pGL2-c-JunPro WTL	Langer WT-Pomotor des <i>JUN</i> Gens (Bereich -1600-+171).
pGL2-c-JunPro ΔJun1	Kurzer Pomotor des <i>JUN</i> Gens mit modifiziertem Jun1-Bindemotif (Bereich -283-+171).
pGL2-c-JunPro ΔJun2	Kurzer Pomotor des <i>JUN</i> Gens mit modifiziertem Jun2-Bindemotif (Bereich -283-+171).
pGL2-c-JunPro ΔJun1+2	Kurzer Pomotor des <i>JUN</i> Gens mit modifiziertem Jun1- und Jun2-Bindemotif (Bereich -283-+171).

Weitere Konstrukte, die im Zusammenhang mit der Herstellung Tetrazyklin induzierbarer shRNAs standen, sind in **Kapitel 3.2.18** gesondert aufgeführt. Hierbei handelt es sich um die Klonierung synthetischer DNA-Fragmente in den Vektor pENTR™/H1/TO, welcher bereits in linearisierter Form mit synthetischen Überhängen (Klonierungsstelle) von Invitrogen angeboten wird.

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

ATF-1 (FL-1)	Santa Cruz, USA
ATF-2 (N-96)	Santa Cruz, USA
ATF-3 (C-19)	Santa Cruz, USA
ATF-3 (H-90)	Santa Cruz, USA
ATF-7 (E-13)	Santa Cruz, USA
B-ATF (H-19)	Santa Cruz, USA
c-Fos (4)	Santa Cruz, USA
c-Jun (H-79) (für WB, EMSA)	Santa Cruz, USA
c-Jun (N) (für IP)	Santa Cruz, USA
c-Jun (ab31419) (für IP)	Abcam, UK
CREB-1 (H-74)	Santa Cruz, USA
CREB-2 (H-290)	Santa Cruz, USA
c-Rel (C)	Santa Cruz, USA
DEK (H-300)	Santa Cruz, USA
DDX21 (NB100-1717)	Novus Biologicals
FLAG-Antikörper (M2 & M5)	Sigma, München
FosB (102)-G	Santa Cruz, USA
FRA-1 (R-20)	Santa Cruz, USA
FRA-2 (L-15)	Santa Cruz, USA
GATA-1 (N-6)	Santa Cruz, USA
GATA-2 (CG2-96)	Santa Cruz, USA
GATA-3 (HG3-31)	Santa Cruz, USA
HA-Antikörper (Y-11)	Santa Cruz, USA
HMG-I (K-12)	Santa Cruz, USA
I κ B α (C-21)	Santa Cruz, USA
IKK γ (FL-419)	Santa Cruz, USA
ILF-2 (ab28772)	Abcam
IRF-1 (C-20)	Santa Cruz, USA
IRF-2 (C-19)	Santa Cruz, USA
IRF-4 (M-17)	Santa Cruz, USA
JNK1 (FL)	Santa Cruz, USA
JNK2 (D-2)	Santa Cruz, USA
JunB (C-11) (für EMSA, WB)	Santa Cruz, USA
JunB (N-17) (für EMSA, IP)	Santa Cruz, USA
JunD (329)	Santa Cruz, USA
NIK (#4994)	Cell Signaling
NIK (H-248)	Santa Cruz, USA
p65 (C-20)	Santa Cruz, USA
p65 (A)	Santa Cruz, USA
p100/p52 (C-5)	Santa Cruz, USA
p100/p52 (06-361)-M	Upstate/Millipore
p100/p52 (06-413)-R	Upstate/Millipore
p105/p50 (D-17)	Santa Cruz, USA
PARP-1 (F-2)	Santa Cruz, USA
Rabbit (DA1E) IgG Isotype Control	Cell Signaling
RelB (C-19)	Santa Cruz, USA
RelB (C1E4 / #4922S)	Cell Signaling
T7-Antikörper	Novagen, USA
Tet-Repressor monokl.IgG1 mix	MoBiTec
TopoI (C-21)	Santa Cruz, USA

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper gekoppelt mit Peroxidase (HRP) zur Detektion im Westernblot:

Anti-Kanninchen IgG	Biolabs, UK
Anti-Maus IgG	Biolabs, UK
Anti-Ziege IgG	Biolabs, UK

Des Weiteren wurden sekundäre Antikörper verwendet, die zur Vermeidung einer unspezifischen Reaktion mit primären Antikörpern anderer Spezies vorgereinigt waren. Die Antikörper sind ebenfalls mit einer Peroxidase (HRP) gekoppelt.

Esel Anti-Kaninchen	Jackson, Immuno-Research Europe, UK
Esel Anti-Maus	Jackson, Immuno-Research Europe, UK

2.8 Lösungen und Puffer

Baeuerle-Puffer:

20mM HEPES (pH 7,9 bei 4 °C), 350 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1% NP40, 20% Glycerol (v/v); Vor Gebrauch: 1mM DTT und Inhibitorzusätze: 10 mM NaF, 8 mM β -Glyzerophosphat, 300 μ M Na-Vanadat, 1 Tablette/50ml Complete (Roche)

Blot-Puffer:

25 mM Tris / HCl pH 8,3, 10% Methanol, 0,01% SDS (w/v)

Chromatographie-Puffer BC50 (Niedrigsalzpuffer für Gradienten):

20mM TRIS (pH 7,9 bei 4 °C), 50 mM KCl, 20% Glycerol (v/v), 1mM EDTA; Vor Gebrauch: 0,5 mM Pefabloc, 1mM DTT

Chromatographie-Puffer BC500 (Hochsalzpuffer für Gradienten):

20mM TRIS (pH 7,9 bei 4 °C), 500 mM KCl, 20% Glycerol (v/v), 1mM EDTA; Vor Gebrauch: 0,5 mM Pefabloc, 1mM DTT

Dignam A:

10 mM HEPES-KOH (pH 7.9 bei 4°C), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂;

Vor Gebrauch: 0,5 mM Pefabloc, 0,5 mM DTT

Dignam C:

25% Glycerol (v/v), 20 mM HEPES-KOH (pH 7.9 bei 4 °C), 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂;

Vor Gebrauch: 0,5 mM Pefabloc, 0,5 mM DTT

Coomassie Färbelösung:

50% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v), 0,025% Coomassie Brilliant Blue

Coomassie Entfärbelösung:

10% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)

DNA-Probenpuffer (6x):

1% Bromphenolblau, 1% Xylencyanol, 40%Glycerol (v/v), H₂O

EMSA-Bindpuffer (2x):

40 mM HEPES (pH 7,9), 120 mM KCl, 8% Ficoll (v/v)

HBS (2x, HEPES-Buffered-Saline):

25 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,2 mM Na₂HPO₄

Kinase Reaktionspuffer:

20mM HEPES (pH 7,5), 10mM MgCl₂, 20 μ M ATP;

Vor Gebrauch: 1mM DTT und Inhibitorzusätze: 20mM β -Glyzerophosphat, 200 μ M Na-Vanadat, 1mM DTT

Klenow-Puffer:

10mM TRIS (pH 7,5), 1mM DTT, 10 mM MgCl₂

NP40-Lyse Puffer für Koimmunopräzipitationen:

50mM HEPES (pH7,5 bei 4 °C), 150mM NaCl, 1mM Glycerol, 0,2% NP40; Vor Gebrauch: 1mM DTT und Inhibitorzusätze: 10 mM NaF, 8 mM β -Glyzerophosphat, 300 μ M Na-Vanadat, 1 Tablette/50ml Complete (Roche)

Oligonukleotid Hybridisierungs-Puffer (Annealing-Puffer):

10mM TRIS (pH 7,4), 100mM NaCl

PBS (Phosphat Buffered Saline):

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2HPO_4 , pH 7,3

Sammelgel:

125mM TRIS (pH6,8), 5% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED

SDS-PAGE Laufpuffer

25mM TRIS, 192mM Glycin, 0,1% SDS, pH 7,3

SDS-Probenpuffer (4x)

125mM TRIS (pH6,8), 50% Gylzerin, 6% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol

Semidry-Blotting-Puffer:

48mM TRIS (pH8,3), 39mM Glycin, 20% Methanol, 0,037% SDS (w/v)

Standard Lysepuffer **PD300**

20 mM TRIS (pH 7,9 bei 4 °C), 300mM NaCl, 1mM MgCl_2 , 0,2 mM EDTA, 0,5% NP40;

Vor Gebrauch: 1mM DTT und Inhibitorzusätze: 10 mM NaF, 8 mM β -Glyzerophosphat, 200 μ M Na-Vanadat, 1 Tablette/50ml Complete (Roche)

Komplement-Puffer **PD0** für PD300:

siehe PD300 ohne NaCl

Stripping-Puffer für Westernblots:

0,2M Glycin, 0,1% SDS, 1% Tween20, pH2,2

TBE (TRIS-Buffered-EDTA 20x):

1 M Tris-HCl pH 8,3, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA

TBS (TRIS-Buffered-Saline 20x):

400 mM Tris-HCl pH 7,6, 2,5 M NaCl,

TBST (TRIS-Buffered-Saline+Tween):

1 \times TBS + 0,1% Tween

Trenngel:

375 mM TRIS (pH 8,8), 6-12% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,075% APS, 0,05% TEMED

Alle weiteren Puffer und Lösungen sind in der Beschreibung der zugehörigen Methode aufgeführt.

2.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide als Sonde für den EMSA:

H-2K κB (aus dem *HLA-A*-Promotor (MHC-I)):

```
5' - gatcCAGGGCTGGGGATTCCCCATCTCCACAGG -3'
3' -      GTCCCGACCCCTAAGGGGTAGAGGTGTCCctag-5'
```

TRE (aus dem Collagenase-Promotor):

```
5' - agctAGCATGAGTCAGACAC -3'
3' -      TCGTACTCAGTCTGTGtcga-5'
```

Jun1/URE1 (aus dem *JUN* Promotor):

```
5' - agctTGTGACATCATCCG -3'
3' -      ACACTGTAGTAGGCctag-5'
```

Jun2/URE2 (aus dem *JUN* Promotor):

```
5' - agctTGATTACCTCATCCG -3'
3' -      ACTAATGGAGTAGGCctag-5'
```

Oligonukleotide für synthetische *JUN* Promotor Varianten (Veränderung in rot):

JunPro78:

```
5' - agc tAG CAT TAC CTC ATC CCG TGA GCC TCC GCG GGC CGT GGA
      GTC TCC ATG GTG ACA TCA TGG GCT ATT TTT AGG GGT-3'
3' -TCG TAA TGG AGT AGG GCA CTC GGA GGC GCC CGG CAC CTC AGA
      GGT ACC ACT GTA GTA CCC GAT AAA AAT GGG Gat cga-5'
```

für JunPro78-ΔJun1:	5' -TGA CAT CA-3' verändert zu 5' -TGA TGT CA-3'
für JunPro78-ΔJun2:	5' -TTA CCT CA-3' verändert zu 5' -TGA GGT AA-3'
für JunPro78-ΔJun1:	5' -TGA CAT CA-3' verändert zu 5' -TGA TGT CA-3'
für JunPro78-ΔJun2:	5' -TTA CCT CA-3' verändert zu 5' -TGA GGT AA-3'

JunPro150:

```
5' - aca cac GCG GAG CAT TAC CTC ATC CCG TGA GCC TCC GCG GGC
      CCA GAG AAG AAT CTT CTA GGG TGG AGT CTC CAT GGT GAC GGG
      CGG GCC CGC CCC CCT GAG AGC GAC GCG AGC CAA TGG GAA GGC
      CTT GGG GTG ACA TCA TGG GCT ATT TTT AGG-3'
3' -CGC CTC GTA ATG GAG TAG GGC ACT CGG AGG CGC CCG GGT CTC
      TTC TTA GAA GAT CCC ACC TCA GAG GTA CCA CTG CCC GCC CGG
      GCG GGG GGA CTC TCG CTG CGC TCG GTT ACC CTT CCG GAA CCC
      CAC TGT AGT ACC CGA TAA AAA TCC cac aca-5'
```

Primer für die PCR, RT-PCR und die Sequenzierung:

Name:	Sequenz:	T _{Annealing} :
T7-Primer:	5' -TAA TAC gAC TCA CTA TAg gg-3'	50°C
Sp6-Primer:	5' -ATT TAg gTg ACA CTA TAg-3'	50°C
M13R2-Primer:	5' -CAC Agg AAA CAg CTA TgA CCA T-3'	50°C
M13-fw-Primer:	5' -gTA AAA CgA Cgg CCA gT-3'	50°C
M13-rev-Primer:	5' -ggA AAC AgC TAT gAC CAT g-3'	50°C
mU6F2-Primer:	5' -CCC ACT AgT ATC CgA CgC CgC CAT CTC TA-3'	50°C
RT_p100_1_fw:	5' -ggC TTC CgA TTT CgA TAT gg-3'	50°C
RT_p100_1_rev:	5' -TTg CTA TCA Tgg ATg ggC Tg-3'	
RT_MAP3K14_1_fw:	5' -ACC gAg AAg AAg TCC ACT gg-3'	55°C
RT_MAP3K14_1_rev:	5' -ggC CAT CAg gTT gAA gAC AC-3'	
RT_p65_1_fw:	5' -CTg CCg ggA Tgg CTT CTA T-3'	55°C
RT_p65_1_rev:	5' -CCg CTT CTT CAC ACA CTg gAT-3'	
RT_GAP-DH_fw:	5' -TgA Agg TCg gAg TCA ACg gAT TTg gT-3'	55°C
RT_GAP-DH_rev:	5' -CAT gTg ggC CAT gAg gTC CAC CAC-3'	
RT_c-Jun_fw:	5' -gTg CgC TCT TAg AgA AAC TTT CCC-3'	60°C
RT_c-Jun_rev:	5' -gAA gTT gCT gAg gTT TgC gTA gAC-3'	
ATF-3-FL_fw:	5' -ATg ATg CTT CAA CAC CCA ggC-3'	55°C
ATF-3-FL_rev:	5' -TTA gCT CTg CAA TgT TCC TTC-3'	
c-Jun-1600_KpnI_fw:	5' -ggg <u>ggT</u> <u>ACC</u> gAC TTA AAC TgC TgC Agg TCC AAC-3'	55°C
c-Jun-279_KpnI_fw:	5' -ggg <u>ggT</u> <u>ACC</u> Agg ggA CCg ggg AAC AgA g-3'	55°C
c-Jun+171_HindIII_rev:	5' -ggg <u>CAA</u> <u>gCT</u> <u>TCg</u> ggA gCC ACA ggC gCT Ag-3'	

2.10 Medien

2.10.1 Bakterienkulturmedien

LB: 10 g/l Bacto tryptone, 5 g/l Bacto yeast extract, 10 g/l NaCl, pH 7,0

LB-Agar: LB mit 15 g/l Agar

SOB: 20 g/l Bacto tryptone, 5 g/l Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 7,0

SOC: 10 g/l Bacto tryptone, 5 g/l Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 0,4% D-Glucose pH 7,0

2.10.2 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien wurden von GibcoBRL oder PAA bezogen.

DMEM: Das Medium wurde supplementiert mit 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin, 1% (v/v) Na-Pyruvat und 10% (v/v) FCS.

RPMI-1640: Das Medium wurde supplementiert mit 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin, 2% (v/v) L-Glutamin und 10%-20% (v/v) FCS. Für die Selektion von Hodgkin T-REx Zellen mit stabilen induzierbaren shRNA's wurde Advanced RPMI-1640 (GibcoBRL) mit 5% Tetrazyklin freiem FCS (PAA) verwendet, welches mit 10 mM Hepes, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 2% (v/v) L-Glutamin supplementiert wurde.

OptiMEM: Das vollsynthetische Medium wurde ohne weitere Zusätze zur Transfektion mittels Lipofektion (**Kapitel 3.1.5.2**) von HeLa Zellen sowie für die Transfektion mittels Elektroporation (**Kapitel 3.1.5.3**) von Hodgkinzellen und Referenzzellen benutzt.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen

HeLa und HEK-293 Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, auf 60 mm oder 90 mm Zellkulturschalen mit DMEM und 10% FCS im CO₂-Inkubator bei einer Luftfeuchtigkeit von 95% mit 5% CO₂ (v/v) kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte jeden zweiten beziehungsweise dritten Tag durch Ablösen der zuvor zweifach mit PBS gewaschenen konfluenten Zellen mit 1ml Trypsin / EDTA (0,5% Trypsin / 0,5% EDTA in PBS). Durch Zugabe von DMEM mit 10% FCS wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen konnten im Verhältnis 1:3 – 1:4 verdünnt ausplattiert werden.

3.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Anzucht und Haltung der in dieser Arbeit verwendeten Suspensionszelllinien erfolgte in RPMI-1640-Medium mit 10%-20% FCS. Alle zwei bis drei Tage wurde die Suspension mit frischem Medium auf ca. 3-5 x 10⁵ Zellen / ml eingestellt. Die Haltung erfolgte für gewöhnlich in Zellkulturflaschen und bei einem größeren Suspensionsvolumen in Spinnerflaschen.

3.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Anlegen von Zellvorräten wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Adhärenent wachsende Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70% trypsiniert (**Kapitel 3.1.1**), in frischem Medium aufgenommen und 5 min bei 1000×g in der Tischzentrifuge pelletiert. Die Zellen einer 90 mm Zellkulturschale wurden in 1 ml Gefriermedium (DMEM, 20% FCS, 15% DMSO) resuspendiert und in Gefriergefäßen (Nalgene) über Nacht in einem Zellgefrierkontainer (Nalgene) auf -70°C langsam abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Suspensionszellen wurden bei einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen / ml bei 1000×g abzentrifugiert. Je 1 x 10⁷ Zellen wurden in 1 ml Gefriermedium (RPMI-1640, 20% FCS, 15% DMSO) aufgenommen und wie oben beschrieben eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen transferiert, mit 10 ml Medium und 10% FCS versetzt und zur Entfernung von DMSO 5 min bei 1000×g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert und auf 90 mm Zellkulturschalen bzw. T-Flaschen verteilt. Am Folgetag erfolgte erneut ein Mediumwechsel.

3.1.4 Behandlung eukaryontischer Zellen mit Stimulatoren

Die Stimulation von adhärenent wachsenden Zellen sowie Suspensionszellen erfolgte durch direkte Zugabe der Reagenzien in das Medium. Wenn nicht anders angegeben wurden pro Milliliter Medium folgende Endkonzentrationen eingesetzt: TNFα 20 ng/ml, PMA 75ng/ml und LPS 10 µg/ml. Die Zeitpunkte der Stimulation richteten sich nach dem jeweiligen Experiment und sind in der Beschreibung der entsprechenden

Methode angegeben.

3.1.5 Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid DNA

HEK-293 Zellen wurden mit der unter **Kapitel 3.1.5.1** beschriebenen CaPO_4 -Methode (Graham und van der Eb, 1973) transfiziert. Bei HeLa Zellen wurde die Plasmid-DNA durch Lipofektion (**Kapitel 3.1.5.2**) in die Zellen eingeschleust und Hodgkin- sowie Referenzzellen wurden durch Elektroporation (**Kapitel 3.1.5.3**) transfiziert. Bei allen Transfektionen eukaryotischer Zellen, wurde die jeweils angegebene Menge an Gesamt-DNA durch Zugabe des jeweiligen Leervektors erreicht.

3.1.5.1 Transfektion nach der CaPO_4 -Methode

Die CaPO_4 -Methode basiert auf der Ausbildung von CaPO_4 -Kristallen, welche Plasmid-DNA eingeschlossen haben. Durch die unspezifische Aufnahme dieser Kristalle in die Zellen erfolgt die Internalisierung der Plasmid-DNA. HEK 293 Zellen wurden am Vortag so verdünnt, dass sie zum Zeitpunkt der Zugabe des Transfektionsansatzes eine Konfluenz von 40-50% hatten. Für eine 90 mm Schale wurden bei Raumtemperatur 10 μg Gesamt-DNA mit 37 μl 2M CaCl_2 -Lösung versetzt und das Volumen mit bidestilliertem Wasser auf 300 μl aufgefüllt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 300 μl 2xHBS mit pH 7,2 vorgelegt und das DNA/ CaCl_2 -Gemisch tröpfchenweise unter Vortexen hinzugegeben. Die Suspension wurde 20 min bei RT belassen und anschließend vorsichtig unter gleichmäßiger Verteilung auf die Zellen pipettiert. 24 - 36 h später wurden die Zellen geerntet. Für die Herstellung stabiler Linien wurde die Vektor-DNA zuvor mit einer Restriktionsendonuklease linearisiert.

3.1.5.2 Transfektion mittels Lipofektion

Bei der Lipofektion von HeLa-Zellen mit Lipofectamine[®]2000 (GibcoBRL) bildet das liposomenhaltige Reagenz mit der zugegebenen DNA spontan Komplexe, in denen die DNA eingeschlossen ist. Diese Komplexe können mit der Zellmembran fusionieren und so ihren Inhalt, die DNA, in die Zellen entlassen. Die Zellen wurden in 35 mm Zellkulturschalen ausplattiert und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 70 - 80% zweimal mit OptiMEM (GibcoBRL) auf der Zellkulturschale gewaschen und anschließend mit 1000 μl OptiMEM auf der Zellkulturschale überschichtet. Die DNA (800 ng Gesamtansatz) und die vierfache Menge (w/v) Lipofectamine[®]2000 (3,2 μl) wurden in jeweils 100 μl OptiMEM aufgenommen und anschließend sorgfältig gemischt. Nach 15 – 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Liposom / DNA-Gemisch auf die Zellen gegeben und für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Transfektion durch Zugabe von 4 ml DMEM (10% FCS) gestoppt. Die Zellen wurden 24 – 36 h nach der Transfektion geerntet. Für die Herstellung stabiler Linien wurde die Vektor-DNA zuvor mit einer Restriktionsendonuklease linearisiert.

3.1.5.3 Transfektion durch Elektroporation

Die Elektroporation von Zellen nutzt die Tatsache, dass Zellen, die einem Stromimpuls ausgesetzt werden Makromoleküle, wie z.B. DNA, aufnehmen. Für jede Zelllinie muss die Stärke und Intensität des jeweiligen Impulses, sowie die Menge der eingesetzten DNA in Vorversuchen ermittelt werden. L428 Zellen wurden gezählt und auf 5×10^5 Zellen / ml Medium verdünnt und für 6 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden erneut gezählt und pro Transfektionsansatz 8×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 400 µl frischem OptiMEM-Medium aufgenommen und zu 30 – 40 µg DNA gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und in eine Elektroporationskuvette (0,4 cm Spalt) überführt. Die Zellen wurden mit 200 V und 975 µF elektroporiert. Die zugehörige Zeitkonstante lag zwischen 28 – 31 ms. Für Elektroporationskuvetten mit 0,2 cm Spalt erfolgte die Elektroporation bei 100 V und 975 µF in 200 µl Suspension, welche 4×10^6 Zellen enthielt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 5 – 10 min in der verschlossenen Kuvette auf Eis inkubiert und anschließend vorsichtig in 5-10 ml Medium in eine T-Flasche überführt. Nach 36 bis 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen entweder direkt für das jeweilige Experiment verwendet, oder wie unter **Kapitel 3.1.6** beschrieben mit der Selektion stabiler Klone begonnen. Die folgenden Spannungen wurden für die jeweiligen Zelllinien bei einer Kapazität von 975 µF unter Verwendung einer Gesamtmenge von 50 µg DNA als optimal ermittelt:

HDLM-2:	200V mTE*	14,5%	
KMH-2 :	180V mTE*	37%	
L428 :	200V mTE*	44,5%	
L540 :	200V mTE*	28,5%	
L591 :	220V mTE*	40%	
L1236 :	180V mTE*	14%	
Namalwa :	240V mTE*	16%	*: mTE = maximale Transfektionseffizienz

Diese Werte gelten für den Standardansatz von 8×10^6 Zellen in 400µl OptiMEM-Medium und unter Verwendung von Elektroporationskuvetten mit einem Spalt von 0,4 cm. Für Elektroporationskuvetten mit einem Spalt von 0,2 cm wurden Spannung, Zellzahl, Volumen und DNA-Menge halbiert die Kapazität jedoch konstant bei 975 µF gehalten.

3.1.6 Stabile Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Hodgkin-Zellen wurden wie unter **Kapitel 3.1.5.3** beschrieben transfiziert und nach 36 h die Zahl der lebenden Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit Medium gewaschen und so aufgenommen, dass die Zelldichte nicht über 5×10^5 Zellen lag. Dem Medium wurde je nach dem verwendeten Plasmid entweder 450 µg Geneticin (G-418), 100 µg Zeocin oder 4-10 µg Blastizidin (abhängig von der jeweiligen Hodgkinzelllinie) pro Milliliter Medium zur Selektion der transfizierten Zellen zugesetzt. Die Zellen wurden täglich gezählt und, sobald die Zellzahl wieder zunahm, so verdünnt, dass sich theoretisch in 500 µl Medium je 1 Zelle befand (Einzelklonselektion). 150 µl dieser Verdünnung wurden pro Loch auf drei 96 Loch-Platten mit Rundboden verteilt. Der Selektionsdruck wurde durch Zugabe des

jeweiligen Selektionsreagenz aufrechterhalten. Nach 1-2 Wochen konnte in einigen Löcher Zellhaufen, die aus der Teilung nur einer einzigen Zelle hervorgegangen waren, beobachtet werden. Diese Klone wurden in frischem Medium verdünnt und in eine 24 Loch-Platten überführt. Bei Erreichen von einer Dichte über 5×10^5 Zellen / ml Medium wurden sie weiter verdünnt. So früh wie möglich wurden von den einzelnen Klonen Gefrierkulturen angelegt. Die stabile Expression der transfizierten Konstrukte wurde durch SDS-PAGE (**Kapitel 3.3.2**) und immunologischen Nachweis (**Kapitel 3.3.5**) der auf PVDF-Membranen übertragenen Proteine (**Kapitel 3.3.4**) kontrolliert.

3.1.7 Gewinnung von Zellextrakten

Suspensionszellen wurden bei $1000 \times g$ abzentrifugiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde, sofern nicht anders angegeben, entweder in Baeuerle Puffer oder in PD300 Puffer lysiert. Adhärenzte Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS direkt auf der Zellkulturschale in dem jeweiligen Puffer lysiert. Die Zellen wurden abgeschabt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, bei 4°C für 45 min auf einem Drehrad inkubiert und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 10 min mit 14000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Gefäß überführt und bei -80°C gelagert. Für die Herstellung großer Mengen von Extrakten, welche nach Kern und Zytoplasma fraktioniert wurden, kam das Dignam-Roeder-Protokoll zur Anwendung (Dignam, *et al.*, 1983; Carey, *et al.*, 2009).

3.2 Nukleinsäuretechniken

3.2.1 Ethanolpräzipitation von DNA

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und 2 Volumen eiskalten absoluten Ethanol versetzt und gut gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für mindestens 30 min bei -80°C bzw. 60 min bei -20°C . Die DNA wurde durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 4°C mit 14000 UpM für 15 min pelletiert und einmal mit $100 \mu\text{l}$ eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde entweder in TE (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) oder alternativ in bidestilliertem Wasser aufgenommen.

3.2.2 DNA-Reinigung

3.2.2.1 Phenolextraktion

Zur Reinigung von DNA in einer wässrigen Lösung, wurde diese mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Das verwendete Phenol war mit TE-Puffer gesättigt und hatte bei der Zugabe Raumtemperatur. Die Suspension wurde ausgiebig gevortext, wodurch die in der Lösung befindlichen Proteine durch das Phenol denaturiert wurden. Im Anschluss wurde das Gemisch für 10 min bei Raumtemperatur mit 14000 UpM abzentrifugiert. Die denaturierten Proteine befanden sich in einer Grenzschicht zwischen der unteren organischen Phase und der oberen DNA-haltigen wässrigen Phase. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt und die DNA wie unter **Kapitel 3.2.1** beschrieben gefällt und abschließend in TE oder Wasser aufgenommen.

3.2.2.2 QIAGEN®-Säulen

DNA, die einer enzymatischen Modifikation wie Restriktion, Endmarkierung oder Dephosphorylierung unterzogen worden war, aber auch PCR-Reaktionen, konnten über Säulen („QIAquick PCR Purification Kit“ oder „QIAquick Nucleotide Removal Kit“) der Firma QIAGEN® nach den Vorschriften des Herstellers aufgereinigt werden.

3.2.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA über ein Agarosegel verfolgt das Ziel die gewünschte DNA von DNA-Fragmenten anderer Größen oder nicht inkorporierten Nukleotiden zu trennen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem präparativen Agarosegel wurde die mit Ethidiumbromid angefärbte und unter UV-Licht sichtbar gemachte DNA-Bande ausgeschnitten. Für die Visualisierung der Banden kam der Dark Reader® Transilluminator der Firma Clare Chemical Research zur Anwendung. Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit" nach Angaben des Herstellers (QIAGEN®).

3.2.3 Restriktionsanalyse

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen und hydrolysieren in diesen an definierten Stellen die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge. Hierbei entstehen je nach Enzym 5'- oder 3'-Überhänge („sticky ends“) beziehungsweise glatte („blunt ends“) Enden. Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen und entsprechende Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein typischer Restriktionsansatz enthielt neben der in bidestilliertem Wasser gelösten DNA, 1/10 Volumenteil 10 x Restriktionspuffer und entsprechende Mengen des Restriktionsenzym (max. 10% des Reaktionsendvolumens). Im Allgemeinen reichten 1 - 2 U des Enzyms aus, um 1 µg DNA zu schneiden. Die Inkubation erfolgte 1 – 2 h bei 37°C. Die Restriktion wurde durch Hitzinaktivierung des Restriktionsenzym oder durch die Aufreinigung der DNA beendet.

3.2.4 Dephosphorylierung von DNA-Enden

DNA-Ligasen benötigen 3'-OH- und 5'-Phosphatgruppen am Ende von doppelsträngigen DNA-Fragmenten, die miteinander verbunden werden sollen. Durch Behandlung der DNA mit alkalischer Phosphatase („Shrimp Alkaline Phosphatase“; SAP) können die 5'-Phosphatgruppen entfernt werden und so die Religation von zuvor gespaltenen Restriktionsschnittstellen verhindert werden. Die Dephosphorylierung erfolgt direkt im Anschluß an den Restriktionsverdau. Sofern möglich wurde das Restriktionsenzym durch einen Inkubationsschritt für 10 min bei 65-70°C inaktiviert, war dies nicht möglich, musste die DNA wie unter **Kapitel 3.2.2.2** beschrieben aufgereinigt werden. Die verwendete Phosphatase konnte in allen Restriktionspuffern verwendet werden. Im Allgemeinen wurden mit 1 U SAP maximal 5 µg DNA bei einer Inkubation von 1 h und 37°C eine vollständige Dephosphorylierung der DNA-Enden erreicht. Im Anschluß an die Dephosphorylierung erfolgte immer eine Aufreinigung der DNA über ein Agarosegel mit anschließender Gelextraktion (**Kapitel 3.2.2.3**).

3.2.5 Ligation

In der Ligrationsreaktion wurden entweder aus Agarosegelen isolierte DNA-Fragmente oder synthetisch hergestellte und hybridisierte Oligonukleotide mit überhängenden Enden eingesetzt. Dazu wurden ca. 100 ng linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA mit einem ca. drei- bis fünffach molaren Überschuß an Insert-DNA in einem Ligrationsansatz mit 1 x Ligationspuffer und 400 U Ligase (BioLabs) über Nacht bei 16°C oder 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.6 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Gleiche molare Mengen von komplementären Oligonukleotiden wurden in Hybridisierungs-Puffer (Annealing-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 8 und 20 mM NaCl) für 5 min bei 95°C in einem Aluminium-Heizblock inkubiert. Der Heizblock wurde abgeschaltet und konnte mit dem Hybridisierungsansatz langsam auf Raumtemperatur abkühlen. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot des Ansatzes auf einem hochprozentigen Agarosegel (1,5-2% Agarose) aufgetrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

3.2.7 Endmarkierung doppelsträngiger DNA mit [³²P]-dATP

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* verfügt neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität auch über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, jedoch besitzt es keine 5'→3'-Exonukleaseaktivität mehr. Daher ist dieses Enzym zum Auffüllen von 5'-überhängender Enden doppelsträngiger Oligonukleotide in Anwesenheit von [³²P]-dATP geeignet. In einer Standardreaktion wurden 200 ng DNA in einem 25 µl Ansatz mit folgenden Komponenten für 30 min bei 30°C inkubiert: 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 250 µM der Desoxynukleotide dCTP, dGTP, dTTP, 40 µCi [³²P]dATP und 1 U Klenow-Enzym (Roche). Das markierte Fragment wurde mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (QIAGEN®) von freien Nukleotiden getrennt (**Kapitel 3.2.2.2**) und die radioaktive Strahlung durch Cerenkow-Messung im Szintillationszähler bestimmt.

3.2.8 Die Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur *in vitro* Amplifizierung von DNA-Bereichen definierter Länge und Sequenz eingesetzt. Für die Einführung zusätzlicher Restriktionsschnittstellen (z.B. für Klonierungen) wurden Primer verwendet, die zusätzlich zur Hybridisierungssequenz auch noch eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease enthielten. Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die in den Expressionsvektor pcDNA3 oder in den Luciferase Vektor pGL2-Basic kloniert werden sollten wurde die Polymerase DeepVent_RTM (exo-) (BioLabs) eingesetzt. Um zu kontrollieren, ob nach einer Transformation von Bakterien das jeweilige Plasmid in den Bakterien vorhanden war, wurde nach einer Plasmidpräparation (**Kapitel 3.2.9**) die AmpliTaq-Polymerase (Applied Biosystems) benutzt. Eine Standardreaktion für eine PCR mit DeepVent®-Polymerase enthielt 50-100 ng Template-DNA, je 50 pmol des Vorwärts- und Rückwärtsprimers, je 400 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 x ThermoPol-Puffer mit MgSO₄, und 1 U Polymerase. Die PCR wurde in einem programmierbaren Thermoblock mit folgendem Programm durchgeführt: nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 min wurden 30 Zyklen von

jeweils 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Hybridisierung der Primer bei 60°C – 70°C (Annealing) und 1 min Synthese pro kb PCR-Produkt des komplementären DNA-Stranges (Elongation) bei 72°C durchgeführt. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die PCR-Fragmente mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ von Primern und Nukleotiden befreit. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transformation von Bakterien wurde eine Bakterienkolonie mit einem Zahnstocher in 20 µl Wasser überführt. Zu den 20 µl wurden die übrigen Bestandteile eines PCR-Ansatzes, (10x Reaktionspuffer, dNTPs, Vor- und Rückwärtsprime, AmpliTaq-Polymerase) zugegeben. Das Gesamtvolumen betrug 25 µl. Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde ein Schritt von 10 min bei 95°C eingefügt, um die Bakterien zu denaturieren. Im Anschluß an die PCR konnte auf einem Agarosegel überprüft werden, ob das entsprechende Template vorhanden war und ein PCR-Produkt synthetisiert werden konnte.

3.2.9 Präparation von Plasmid-DNA nach der Mini-Methode

Bakterienkolonien, die über Nacht auf einer LB-Platte gewachsen waren und nach ihrer Antibiotikaresistenz selektioniert worden waren, wurden in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum inokuliert und für 6 h im Warmluftschüttler (210 UpM) bei 37°C kultiviert. Aus 1,5 ml der Kultur wurden die Bakterien pelletiert und in 150 µl **P1** (25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und durch Zugabe von 150 µl **P2** (0,2 M NaOH, 1% SDS) lysiert. Die Neutralisation des Lysates erfolgte durch Zugabe von 150 µl eiskalter Kaliumacetat-Lösung **P3** (11,5% Eisessig in 5 M KAc), wodurch neben SDS-Proteinkomplexen auch höhermolekulare RNA-Komplexe präzipitiert wurden, während zirkuläre Plasmid-DNA in Lösung blieb. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 UpM wurde der Überstand mit 1 ml Ethanol versetzt und die gefällte DNA durch Zentrifugation wie zuvor pelletiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in ca. 30-50 µl 20 mM Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen.

3.2.10 Präparation von Plasmid-DNA nach der Maxi-Methode

Die Präparation von Plasmiden in größerer Menge erfolgte mit einem DNA-Präparations-Kit der Firma QIAGEN® nach Vorschrift des Herstellers. Hierzu wurden 100 - 200 ml Antibiotika-haltiges Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Warmluftschüttler bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert und weiter nach Angaben des Herstellers lysiert, die DNA über Säulen gereinigt, präzipitiert und nach dem Waschen und der Ethanolpräzipitation (**Kapitel 3.2.1**) in 200 – 500 µl *A. bid.* aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm im UV-Photometer bzw. NanoDrop-Spektrophotometer ND-1000 der Firma PEQLab.

3.2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren weisen ein charakteristisches Absorptionsspektrum im UV-Bereich auf, wobei ein relatives Maximum der optischen Dichte bei ca. 260 nm liegt (A_{260}). Verunreinigungen durch Proteine, die ihr Absorptionsmaximum bei ca. 280 nm haben, lassen sich durch die Bestimmung des Quotienten A_{260} / A_{280} nachweisen. Bei nicht kontaminierten Nukleinsäurenlösungen hat dieser Quotient einen Wert von 1,5-

2,0. Kontaminationen mit Phenol lassen sich anhand einer leichten „Schulter“ des relativen Maximums bei 260 nm erkennen. Bei einer A_{260} von 1,0 enthält eine Lösung ca. 50 µg/ml doppelsträngige DNA, 40 µg/ml einzelsträngige DNA bzw. RNA oder 20 - 25 µg/ml Oligonukleotide. Die Messung erfolgte entweder mit, in *Aqua bidest.*, verdünnter DNA am UV-Photometer Genequant II (Pharmacia) oder es wurden 2 µl unverdünnte Lösung direkt am NanoDrop-Spektrophotometer ND-1000 der Firma PEQLab gemessen und quantifiziert.

3.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten aus Restriktions- oder PCR-Ansätzen dienten native Agarosegele von 0,5 - 2% Agarose in TBE (50 mM Tris pH 8,3, 50 mM Borsäure, 1 mM EDTA). Durch Zugabe von 0,2 µg / ml Ethidiumbromid ließen sich die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar machen. Proben und DNA-Längenstandard (1 kb+ Marker / Gibco BRL) wurden mit 4 x Probenpuffer (0,1% Bromphenolblau, 1% Xylencyanol, 50% Glycerin, 100 mM EDTA) versetzt, aufgetragen und die Elektrophorese in TBE bei 100 V durchgeführt.

3.2.13 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien durch die Calciumchlorid-Methode

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde 250 ml SOB-Medium (**Kapitel 2.10.1**) mit 10 ml einer Übernachtskultur *E. coli* DH5α (in LB mit 10 µg / ml Tetracyclin) angeimpft und bei 18°C bis zu einer OD_{600} von 0,6 geschüttelt. Die für 10 min im Eisbad abgekühlte Bakterienkultur wurde bei 2500xg für 10 min bei 4°C pelletiert und das Bakterienpellet in 80 ml eiskaltem TB (10 mM PIPES pH 6,7, 55 mM $MnCl_2$, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl) resuspendiert. Nach weiteren 10 min auf Eis und erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem TB aufgenommen. Die Suspension wurde mit DMSO versetzt (Endkonzentration von 7%) und in 200 µl und 400 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C gelagert. Die kompetenten Bakterien zeigten eine Transformationseffizienz von $1,5 \times 10^7$ Kolonien pro 1 µg transformierter Plasmid-DNA (siehe auch Inoue, *et al.*, 1990)

3.2.14 RNA Isolation

Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma QIAGEN aus jeweils 5×10^6 Zellen. Die Zellen wurden dazu bei 1000 g abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet durch Vortexen aufgelockert und unter weiterem Vortexen erfolgte dann die Zugabe des RLT-Lysispuffers aus dem RNeasy Mini Kit. Die Proben wurden entweder sofort bei Raumtemperatur nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet, oder im Fall von Zeitverläufen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und später zusammen mit den anderen Proben einer Versuchsreihe aufgearbeitet. Nach der Bestimmung der Konzentration mit dem NanoDrop-1000-Spektrophotometer wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

3.2.15 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR umfasst zwei verschiedene Reaktionen, nämlich die Umschreibung der in der Gesamt-RNA-enthaltenen mRNA in einsträngige c-DNA (reverse Transkription) und die Vermehrung (Amplifikation) der gewünschten Genabschnitte aus der neusynthetisierten c-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (**Kapitel 3.2.8**).

Für die reverse Transkription wurde 2 µg Gesamt-RNA (**Kapitel 3.2.14**) mit 2 µl eines Gemisches von Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dTTP und dGTP) in einer Konzentration von jeweils 10 mM, 4 µl MgCl₂ 25 mM, 500 ng Oligo(dT)₁₅ Primer (Promega) und 1 µl RNase-Inhibitor (50 U/µl) in 2 µl 10xReaktionspuffer und 10 µl sterilem Wasser inkubiert. Zur Denaturierung wurde der Ansatz bei 65°C für 15 min erhitzt. Anschließend wurden 20 U der M-MuLV Reverse Transkriptase (Promega) hinzugefügt. Es folgten zwei weitere Inkubationsschritte bei 25°C für 10 min zur Anlagerung des Primers an die RNA bzw. bei 42°C für 60 min zur c-DNA-Synthese. Die reverse Transkriptase wurde anschließend bei 99°C für 5 min denaturiert. Jeweils 2 µl des denaturierten Ansatzes mit der c-DNA wurden in der PCR (**Kapitel 3.2.8**) mit den entsprechenden spezifischen Primern für ein bestimmtes Zielgen verwendet.

3.2.16 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien durch die Hitzeschockmethode

Für den Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und mit 10-50 ng Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz gemischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 120 Sekunden bei 42°C im Wasserbad und eine weitere Inkubation für 1 min auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl vorgewärmten SOC- oder LB-Medium (**Kapitel 2.10.1**) ohne Antibiotikum wurde die Suspension für 40 min bei 37°C geschüttelt. 50-200 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten (LB-Medium, 15g pro Liter Agar, 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert.

3.2.17 DNA Sequenzierung

Bei der Sequenzierung unter Verwendung eines Kapillar-Sequenzierautomaten, wurde das System der Firma Applied Biosystems (ABI 310) verwendet. Für die Herstellung von Sequenzierprodukten kommt hier eine leicht abgewandelte PCR-Reaktion zur Anwendung, die anstelle von zwei Primern nur einen verwendet („Cycle-Sequenzierung“). Bei diesem System kommen vier verschiedenen Didesoxynukleotide zur Anwendung, welche mit vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelt sind. Bei ihrem Einbau in das PCR-Produkt kommt es dann jeweils zum Kettenabruch und damit zu unterschiedlich langen endständig markierten Produkten. Dadurch ergibt sich der Vorteil, dass pro Sequenzierung nur eine einzige PCR-Reaktion angesetzt werden muss. Für eine Standard-PCR (**Kapitel 3.2.8**) wurden die folgenden Komponenten gemischt und auf 10 µl mit H₂O aufgefüllt:

DNA	200 ng
Sequenzierungsprimer	5 pmol
5x Sequenzierungspuffer	2 µl
ABI PRISM BigDye Terminator v1.1	0,5 µl

Das folgende PCR-Standardprogramm wurde für Sequenzierungsreaktion verwendet:

Initiale Denaturierung:	95°C, 3 min
Denaturierung:	95°C, 35 s
Hybridisierung (Annealing):	50°C, 12 s,
Synthese (Elongation):	60°C, 4 min und zurück zur Denaturierung (35 Schleifen)
Pause:	4°C

Im Anschluß erfolgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes durch Ethanolpräzipitation. Abschließend wurde das Pellet in einer speziellen Formamid-Lösung (Template Suppression Reagent) aufgenommen, für zwei Minuten zur Denaturierung bei 90°C inkubiert und in das Gerät gestellt. Die Bedienung des Sequenzierungsautomaten erfolgte nach Vorschriften des Herstellers. Die so erhaltenen Rohdaten wurden anschließend durch ein Analyseprogramm ausgewertet.

3.2.18 siRNA/shRNA Design

Für eine effiziente Herstellung von **siRNAs** (**s**hort **i**nterfering **R**NA) bieten verschiedenste Biotechnologie-Firmen Programme im Internet an, welche neben einer Auswahl von Zielsequenzen jeder Sequenz auch eine Wahrscheinlichkeit zuordnet, wie gut die siRNA ein bestimmtes Zielgen herunterzuregulieren vermag. Im Rahmen dieser Arbeit kamen die beiden Programme „siDESIGN Center“ von Dharmacon und der „BLOCK-iT™ RNAi Designer“ von Invitrogen zur Anwendung. Diese Programme benötigen meist nur eine Genzugriffsnummer oder eine cDNA-Sequenz als Eingabe und liefern eine Vielzahl möglicher siRNA-Sequenzen mit zusätzlichen Parametern, welche einer Verfeinerung der Auswahl der siRNA dienen sollen. Als zusätzliche Kriterien für die Auswahl der Effektivität und Stabilität der siRNA-Sequenzen wurden, soweit es möglich war, die Regeln nach Reynolds (Reynolds, *et al.*, 2004) befolgt. Die Synthese der synthetischen siRNA-Sequenzen erfolgte durch die Firma Eurogentec, die der synthetischen DNA Sequenzen für die Klonierung in geeignete shRNA-Vektoren durch die Firma BioTEZ. Ausgehend von diesen Vektoren erfolgt die Synthese der **shRNA** (**s**hort **h**airpin **R**NA) ausgehend von einem Polymerase III Promotor (H1, U6 oder 7SK).

Die siRNA Technologie geht auf ein Phänomen zurück, welches erstmals von Fire und Kollegen (Fire, *et al.*, 1998; Fire, 1999) als RNA-Interferenz beschrieben wurde und von Elbashir und Kollegen als molekularbiologische Methode zur Herunterregulierung spezifischer Zielgene entwickelt wurde (Elbashir, *et al.*, 2001-a). Diese Methode basiert auf der Einschleusung doppelsträngiger RNA in eukaryontische Zellen. Diese wird in der Zelle dann durch DICER (RNase III ähnliches Enzym) zu 21-23 Nukleotiden langen doppelsträngigen RNAs, den sogenannten siRNAs, prozessiert (Elbashir, *et al.*, 2001-b). Diese siRNA Moleküle werden nun durch den **RISC** Komplex (**R**NA **I**nduced **S**ilencing **C**omplex) gebunden. Im Anschluß erfolgt in einem ATP-abhängigen Prozess die Aufwindung des Doppelstranges, wobei nur der Gegenstrang (Antisense zur mRNA) in den RISC-Komplex eingebaut wird. Der RISC-Komplex bindet nun an die für die siRNA spezifische mRNA, wobei der am Komplex gebundene Gegenstrang mit der mRNA

paart, und spaltet die mRNA. Für die Spaltung der mRNA ist, nach Reynolds, das Vorhandensein eines Adenin oder Uracil an Basenposition 10 des Sense-Stranges der siRNA eine wichtige Voraussetzung. Weitere Voraussetzungen einer optimalen siRNA nach Reynolds sind: ein GC-Gehalt zwischen 30% und 52%, mindesten 4 Adenine oder Uracile am Ende des Sense-Stranges der siRNA (Position 15-19), keine Palindrome, welche Haarnadelstrukturen fördern, nach Möglichkeit ein Adenin an Position 3 und 19 und kein Guanin oder Cytosin an Position 19 sowie ein Guanin an Position 13. Diese Vorgabe von bestimmten Basen an definierten Positionen scheint eng mit der Funktionsweise des RISC-Komplexes im Zusammenhang zu stehen. Unter Beachtung aller dieser Vorgaben kann die Funktionalität der siRNA verdoppelt oder gar verdreifacht werden (Reynolds, *et al.*, 2004).

Die Präparation der siRNA-Duplices durch Hybridisierung der synthetischen komplementären siRNA-Stränge erfolgte wie in **Kapitel 3.2.6** beschrieben. In diesem Fall erfolgte die Herstellung des Annealing-Puffers jedoch mit RNase-freiem Wasser. Die hybridisierten siRNA Moleküle wurden in 20 µl Aliquots bei einer Temperatur von -80 °C gelagert und direkt für die Transfektion eingesetzt. Die hybridisierten DNA Moleküle für die Synthese der shRNAs wurden über die entsprechenden Überhänge in einen geeigneten Vektor kloniert (siehe unten sowie **Kapitel 3.2.5** und **4.4.3.2**). Die Klonierung dieser DNA Moleküle erfolgte unter Verwendung der mit dem Kit (BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit) mitgelieferten Puffer und Lösungen nach Angaben des Herstellers Invitrogen. Die hergestellten Konstrukte wurden mittels Hitzeschock Methode (**Kapitel 3.2.16**) in *E.coli* One SHOT® TOP10 (**Kapitel 2.4**) transformiert und auf LB-Platten mit 100 µg / ml Ampicillin ausgestrichen. Am folgenden Tag wurden jeweils 5 ml LB-Medium mit 100 µg / ml Ampicillin mit zwanzig Einzelkolonien von jeder Platte angeimpft und nach 24 Stunden erfolgte die Präparation der Plasmid DNA nach dem Mini-Protokoll (**Kapitel 3.2.9**). Anschließend wurden 300 ng jeder präparierten DNA für die Sequenzierung (**Kapitel 3.2.17**) entweder mit dem M13 Rückwärts Primer oder alternativ mit dem H1 Vorwärts Primer verwendet. Die Sequenzierung der klonierten shRNA's aus beiden Richtungen war teilweise notwendig, da Haarnadelstrukturen meist schwierig zu sequenzieren sind. Die als positiv identifizierten Plasmid-DNA's wurden anschließend transient mittels Lipofektion (**Kapitel 3.1.5.2**) in HeLa Zellen transfiziert um zu überprüfen, ob die Herunterregulation des jeweiligen Zielgens effizient genug ist. Die shRNA's mit den besten Ergebnissen hinsichtlich der Herunterregulation des Zielgens und ohne unspezifische Effekte, den sogenannten Off-Target-Effekten, wurden anschließend für die stabile Transfektion (**Kapitel 3.1.6**) der zuvor hergestellten Tet-Repressor Zelllinien verwendet. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte in 96-Loch-Platten mit Rundboden unter kontinuierlicher Gabe von 100 µg Zeocin pro Milliliter Medium. Als Medium für die Selektion wurde hier speziell Advanced RPMI-1640 (GibcoBRL) mit 5% Tetrazyklin-freiem FCS (PAA) verwendet, welches mit 10 mM Hepes, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 2% (v/v) L-Glutamin supplementiert wurde. Die Verwendung von Tetrazyklin-freiem FCS ist notwendig, um die Expression der shRNA's, bis zu dem Zeitpunkt der Induktion mit Tetrazyklin, weitestgehend zu unterbinden.

Die Überprüfung der Einzelklone erfolgte durch die Induktion der Expression der shRNA mittels Gabe von Tetrazyklin. Hierzu wurde der entsprechende Klon auf eine Zelldichte von etwa 3×10^5 Zellen / ml Medium eingestellt und jeweils 10 ml in einer 25 cm² T-Flasche, einmal unbehandelt und einmal mit Tetrazyklin zu

3µg pro Milliliter Medium versetzt. Das Tetrazyklin wurde wegen seiner geringen Stabilität, jeweils direkt vor der Verwendung als 10 mg/ml Stammlösung in Wasser hergestellt und nach Gebrauch verworfen. Der Wechsel des Mediums und die Gabe von frischem Tetrazyklin wurden an jedem zweiten Tag durchgeführt. Positive Klone wurden durch Immunodetektion identifiziert. Maßstab war hier die Effizienz der Herunterregulation des jeweiligen Zielgens zwischen dem unbehandelten und dem Tetrazyklin-induzierten Ansatz. Ausgehend von diesen Vektoren erfolgt nun die Synthese der shRNA.

Da die Vorgehensweise für das Design, die Auswahl, die Klonierung, sowie die Transformation der Hodgkin T-REx Zelllinien und deren Selektion für jede shRNA die Selbe ist, wurden diese experimentellen Vorgänge hier ganz allgemein gehalten, ohne auf eine spezielle shRNA einzugehen. Die verwendeten shRNA Sequenzen sind im Folgenden gelistet.

shRNAs gegen ATF-3 für die Klonierung in den Vektor pmU6:

si-ATF-3-#1-f: 5'- **TTTG** **TGCGCTGGAATCAGTCACT** **TTCAAGAGA** **AGTGACTGATTCCAGCGCA** **TTTTT** -3'
 si-ATF-3-#1-r: 5'- **CTAG** **AAAAA** **TGCGCTGGAATCAGTCACT** **TCTCTTGAA** **AGTGACTGATTCCAGCGCA** -3'
 si-ATF-3-#2-f: 5'- **TTTG** **CTGGAATCAGTCACTGTCA** **TTCAAGAGA** **TGACAGTGACTGATTCCAG** **TTTTT** -3'
 si-ATF-3-#2-r: 5'- **CTAG** **AAAAA** **CTGGAATCAGTCACTGTCA** **TCTCTTGAA** **TGACAGTGACTGATTCCAG** -3'
 si-Ctrl-f: 5'- **TTTG** **TTGAGGAGCTCAAGAACGA** **TTCAAGAGA** **TCGTTCTTGAGCTCCTCAA** **TTTTT** -3'
 si-Ctrl-r: 5'- **CTAG** **AAAAA** **TTGAGGAGCTCAAGAACGA** **TCTCTTGAA** **TCGTTCTTGAGCTCCTCAA** -3'

TTTG	<i>Bbs</i> I Überhang für die Klonierung in pmU6	CTAG	<i>Xba</i> I Überhang für die Klonierung in pmU6
TGCGCTGGAATCAGTCACT	Sense Ziel-mRNA Sequenz	TGCGCTGGAATCAGTCACT	Antisense Ziel-mRNA Sequenz
TTCAAGAGA	Haarnadelstruktur	TTTTT	Polymerase III Terminatorsequenz

shRNAs für die Klonierung in den Vektor pENTR™/H1/TO:

shRNA gegen NF-κB 2:

si p52_1_s 5'- **CACC** **GCATCAAACCTGAAGATTCT** **TTCAAGAGA** **AGAAATCTTCAGGTTTGATGC** -3'
 si p52_1_as 5'- **AAAA** **GCATCAAACCTGAAGATTCT** **TCTCTTGAA** **AGAAATCTTCAGGTTTGATGC** -3'
 si p52_2_s 5'- **CACC** **GACATTGAGGTTTCGGTTCTAT** **TTCAAGAGA** **ATAGAACCGAACCTCAATGTC** -3'
 si p52_2_as 5'- **AAAA** **GACATTGAGGTTTCGGTTCTAT** **TCTCTTGAA** **ATAGAACCGAACCTCAATGTC** -3'

shRNA gegen RelB:

si RelB.1_s 5'- **CACC** **GTGGAGATCATCGACGAGT** **TTCAAGAGA** **ACTCGTCGATGATCTCCAA** -3'
 si RelB.1_as 5'- **AAAA** **TTGGAGATCATCGACGAGT** **TCTCTTGAA** **ACTCGTCGATGATCTCCAA** **C** -3'
 si RelB.2_s 5'- **CACC** **GCTGCCATTGAGCGGAAGATT** **TTCAAGAGA** **AATCTTCCGCTCAATGGCAGC** -3'
 si RelB.2_as 5'- **AAAA** **GCTGCCATTGAGCGGAAGATT** **TCTCTTGAA** **AATCTTCCGCTCAATGGCAGC** -3'

shRNA gegen p65:

si p65_MH1_s 5'- CACC GCGCATCCAGACCAACAACAA TTCAAGAGA TTGTTGTTGGTCTGGATGCGC -3'

si p65_MH1_as 5'- AAAA GCGCATCCAGACCAACAACAA TCTCTTGAA TTGTTGTTGGTCTGGATGCGC -3'





si p65_2_s 5'- CACC GAAAGAGGACATTGAGGTGTA TTCAAGAGA TACACCTCAATGTCCTCTTTC -3'

si p65_2_as 5'- AAAA GAAAGAGGACATTGAGGTGTA TCTCTTGAA TACACCTCAATGTCCTCTTTC -3'

Kontroll shRNA:

si Control_s 5'- CACC GTGCTCAACGTCGAGACTTCT TTCAAGAGA AGAAGTCTCGACGTTGAGCAC -3'

si Control_as 5'- AAAA GTGCTCAACGTCGAGACTTCT TCTCTTGAA AGAAGTCTCGACGTTGAGCAC -3'

 Haarnadelstruktur  synth. Überhang für die Klonierung in pENTR™/H1/TO
 Sense Ziel-mRNA Sequenz  Antisense Ziel-mRNA Sequenz

G und **C** sind zusätzlich durch das Programm eingefügte Basen, welche die Stabilität der shRNA erhöhen.

Die Funktionalität der jeweiligen siRNA, die durch einen shRNA-Vektor produziert wird, wurde zuvor durch Transfektion als synthetische siRNA in HeLa oder HEK-293 Zellen getestet. Nur Sequenzen, welche eine effektive Herunterregulation des jeweiligen Zielgens zur Folge hatten, wurden tatsächlich für die Klonierung in den Vektor verwendet.

3.3 Proteinchemische und immunologische Techniken

3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das „Protein Assay dye reagent concentrate“ der Firma Biorad nach Vorschrift des Herstellers angewandt und die Extinktion bei 595 nm am Photometer im Vergleich zu BSA-Standardwerten gemessen.

3.3.2 SDS-PAGE

Für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) wurde die BioRad Mini-Protean II Apparatur mit 7 x 10 cm großen und 0,75 mm dicken Gelen verwendet. Das Trenngel wurde direkt nach dem Gießen mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. In das Sammelgel wurde ein Kamm mit 15 Taschen eingepasst. Die Proteinproben wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt, 3-5 min bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer bei 100 - 150 V durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurden vorgefärbte Molekulargewichtsstandards (Fermentas) aufgetragen.

3.3.3 Coomassiefärbung

Das SDS-Polyacrylamidgel wird für 30 min in der Färbelösung und anschließend in Entfärber, unter mehrmaligem Wechsel der Lösung, inkubiert. Nachdem der Hintergrund vollständig entfärbt war, wurde das Gel in einem Vakuumtrockner für 45 min bei 80°C getrocknet. Die Trocknung erfolgte auf Whatmann-Papier oder zwischen Zellophanfolie.

3.3.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Westernblot)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine können durch die „Western blotting“ Methode auf spezielle Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen übertragen werden (Towbin, *et al.*, 1979). Nach Auftrennung der Proteine in einem SDS-Gel (**Kapitel 3.3.2**), wurden diese durch Elektrotransfer auf einer Membran immobilisiert. Dazu wurde auf das Gel eine Methanol-aktivierte PVDF-Membran (Millipore) gelegt und zwischen Whatman Papier in einer „Semi-Dry“ Blot-Apparatur transferiert. Hier wird das „Blot-Sandwich“ zwischen zwei Edelmetallplatten einer Stromstärke von 60 mA pro Gel für 1 Stunde ausgesetzt. Der Transfer wurde mit Blot-Puffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei der „Semi-Dry“-Methode wird nur der Blot-Puffer benutzt, der von dem Whatman Papier aufgenommen wurde. Im Vergleich zur Tank-Blot Methode, welche alternativ zu dieser Methode verwendet werden kann, ist dies deutlich weniger Puffer, was auch zu der Namensgebung geführt hat. Ein weiterer Vorteil der „Semi-Dry“- Methode ist die sehr kurze Blotzeit von nur einer Stunde, während sie beim Tank-Blot meist über Nacht bei 4 °C geblottet wird.

3.3.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (Immunodetektion)

Durch den Westernblot (**Kapitel 3.3.4**) können membranfixierte Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper immunologisch nachgewiesen werden. Die primären Antikörper werden durch sekundäre

Antikörper detektiert, die an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Diese katalysiert die Chemilumineszenzreaktion von Luminol, bei der sichtbares Licht emittiert wird. Diese Strahlung kann durch das Auflegen eines lichtempfindlichen Films sichtbar gemacht werden.

Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran kurz mit PBS / 0,1% Tween-20 gewaschen und danach für 1 h mit 3% BSA in TBS / 0,1% Tween (Biolabs) blockiert. Blockierung sowie alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1 h in der jeweiligen Blockierungslösung. Nach dreimaligem Waschen der Membran in 1 x TBS / 0,1% Tween für je 5-10 Minuten, erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 45-60 min, erneut dreimaligem Waschen, sowie die anschließende Substratreaktion strikt nach den Angaben des Herstellers.

3.3.6 Chromatographische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit kamen sowohl die Ionenaustauscher-Chromatographie als auch die Affinitätschromatographie mit unterschiedlichen Säulenmaterialien zur Anwendung. Die verwendeten Chromatographiepuffer wurden jeweils am Tag der Anwendung frisch mit Pefablock und DTT supplementiert. Die chromatographische Reinigung erfolgte ausschließlich bei 4 °C, daher wurde der pH-Wert der Chromatographiepuffer bei 4°C eingestellt. Vor jedem Reinigungsschritt erfolgte ein Lauf ohne Proteineextrakt (Leergradient), um eventuelle Verunreinigungen auf der Säule zu entfernen. Nach Beendigung der Reinigung erfolgte die Reinigung und Equilibrierung der Säule nach Angaben des Herstellers des jeweiligen verwendeten Säulenmaterials. Proteineextrakte, beziehungsweise gepoolte Fraktionen der vorhergegangenen Chromatographie, wurden vor dem jeweiligen Reinigungsschritt gegen den Chromatographiepuffer, mit dem die Säule equilibriert wurde, dialysiert. Verwendet wurde bei allen chromatographischen Reinigungsschritten das Econo System der Firma BioRad mit einem Gradientenmonitor für die kontinuierliche Messung der Ionenstärke, einem UV-Monitor zur Messung der Absorption bei 280 nm (Proteinpeaks) sowie einem Fraktionssammler und einer Schlauchpumpe. Die Programmierung des Ionengradienten erfolgte über den Econo-Controller und den Econo-Buffer-Selector.

3.3.6.1 Ionenaustauscher Chromatographie

Die Ionenaustauscher Chromatographie stellt eine effektive Methode zur Reinigung von Proteinen und anderen Molekülen dar, deren Trennung aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung erfolgt. Die zu trennenden Moleküle interagieren dabei über ionische Wechselwirkung mit dem jeweiligen Säulenmaterial (Anionen- oder Kationen-Austauscher) bei einer niedrigen Ionenstärke des Laufpuffers und werden durch einen ansteigenden Ionengradienten vom Säulenmaterial eluiert. Schwache ionische Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial und Molekül bewirken dabei eine frühe Elution bei niedriger Ionenstärke und starke ionische Wechselwirkungen dementsprechend eine späte Elution bei hoher Ionenstärke. Die Chromatographie am Ionenaustauscher wurde für gewöhnlich unter der Verwendung eines kontinuierlich linear ansteigenden Salzkonzentrationsgradienten über 30 bis 60 Minuten durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anionenaustauscherchromatographie mit DE-52 für die Trennung von Nukleinsäuren vom Proteineextrakt und die Kationenaustauscherchromatographie an SP-Sepharose als erster Reinigungsschritt mit

Fraktionierung verwendet. Die experimentellen Details zu den jeweiligen Reinigungsschritten mittels Ionenaustauscher Chromatographie sind im Ergebnisteil, **Kapitel 4.2.1 ff**, dargestellt.

3.3.6.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eine spezifische Methode zur Reinigung von Biomolekülen, die auf bestimmten Eigenschaften hinsichtlich Bindung, Interaktion oder Ligandenspezifität (Substrat, Inhibitor oder Kofaktor) des zu reinigenden Moleküls beruht. Sie ist eine der effektivsten Reinigungsmethoden zur Reinigung von Biomolekülen. Das besondere an der Affinitätschromatographie ist die hochspezifische Bindung des Analyten an den an das Säulenmaterial gekoppelten Liganden. Dies ermöglicht eine Anreicherung von Liganden-spezifischen Faktoren, wobei der Rest des Proteingemisches von diesen getrennt wird. Die Elution der gebundenen Faktoren kann nun entweder durch eine hohe Konzentration an freiem Liganden erreicht werden, was unter Umständen ziemlich teuer sein kann, oder aber wie bei der Ionenaustauscher Chromatographie durch einen ansteigenden Salzkonzentrationsgradienten, der mit steigender Ionenstärke die Affinität zwischen dem Liganden und dem Analyten verringert. Da die Affinitäten verschiedener Proteine zu einem bestimmten Liganden meist unterschiedlich sind, lässt sich auf diese Weise ebenfalls eine recht gute Trennung von Proteinen erreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedenen Affinitätsreinigungsschritte verwendet um eine Anreicherung von DNA-bindenden Faktoren zu erzielen. Die Heparin-Sepharose diente als erster Anreicherungsschritt der DNA-bindenden Faktoren, jedoch binden neben diesen auch andere Faktoren spezifisch an dieses Säulenmaterial (Koagulationsfaktoren, Lipasen, Wachstumsfaktoren...). Um von diesem Eluat nun spezifisch die DNA-bindenden Faktoren zu trennen, erfolgte in einem weiteren Schritt eine Anreicherung über doppelsträngige DNA-Cellulose. In einem abschließenden Reinigungsschritt sollten dann nur noch Faktoren angereichert werden, spezifisch mit dem *JUN* Promotor interagieren. Für diesen Schritt wurde die Affinitätsmatrix, aus CNBr-aktivierter Sepharose mit kovalent gebundenem *JUN* Promotor-Fragment, selbst hergestellt. Die experimentellen Details zu den jeweiligen Reinigungsschritten mittels Affinitätschromatographie sind im Ergebnisteil, **Kapitel 4.2.1 ff**, dargestellt.

3.3.7 Immunopräzipitation (IP) von Proteinen

Die Immunopräzipitation dient dem spezifischen Nachweis eines Proteins sowie der Anreicherung bestimmter Proteine, aus einem Proteingemisch (Lysat). Durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern werden die Proteine aus Gesamtzelllysat oder fraktioniertem Lysat gebunden und die Präzipitation dieses Antikörper-Protein-Komplexes wird durch die Zugabe von Protein-A beziehungsweise Protein -G, welches an Sepharose gekoppelt ist, erreicht. Protein-A beziehungsweise Protein -G binden die konstante Region der IgG, IgM und IgA Antikörper Unterklassen. Die Protein-G-Sepharose wurde als fertige Suspension gekauft und die Protein-A-Sepharose wurde als Pulver bezogen (GE Healthcare). Die Sepharose wurde nach den Angaben des Herstellers gequollen und vor Gebrauch in den jeweiligen Arbeitspuffer (Lysisbuffer, Puffer für Ko-Immunpräzipitation, ...) umgepuffert. Die Lysate wurden für 60 min mit 20 µl Protein-G-Sepharose beziehungsweise Protein-A-Sepharose vorgereinigt. Im Anschluß daran erfolgte die Zugabe von 2 µg

Antikörper zu jeweils 500 µg - 1,0 mg Gesamtprotein im Lysat, sowie jeweils 20 µl Protein-G-Sepharose beziehungsweise Protein-A-Sepharose. Die Inkubation der Ansätze erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde der an Protein-G-Sepharose beziehungsweise Protein-A-Sepharose gebundene Antikörper-Protein-Komplex durch Zentrifugation (1 min/ 1000×g) vom Lysat getrennt, 3 mal gewaschen und anschließend in 20 µl 2×SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 4 min bei 95°C erhitzt und abschließend auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel geladen.

3.3.8 Ko-Immunpräzipitation

Koimmunopräzipitationen dienen dem Nachweis von Protein-Interaktionen. Die Herstellung von Zelllysaten erfolgte mit PD300-Puffer. Die Extraktion bei 300 mM Salz sollte gewährleisten, dass auch die Kernproteine optimal von der DNA abgelöst werden. Um klare Lysate, frei von eventuell störenden Faktoren, zu erhalten, wurden die Extrakte für 60 min in der Beckman Ultrazentrifuge OPTIMA™ MAX-XP im TLA45 Rotor bei 45000 upm zentrifugiert. Das klare Lysat wurde anschließend 1:1 mit PD0 Komplement-Puffer versetzt um eine Ionenstärke von 150 mM Salz zu erhalten, da Protein-Interaktionen meist bei einer geringeren Ionenstärke von etwa 150 mM studiert werden. Alle weiteren Schritte erfolgten wie unter **Kapitel 3.3.7** beschrieben.

3.3.9 Gelretardations-Assay (EMSA)

Durch den Gelretardations-Assay, kurz **EMSA** (**E**lectrophoretic **M**obility **S**hift **A**ssay), werden sequenzabhängige DNA-Protein Interaktionen nachgewiesen. Dieser Versuch kann entweder mit gereinigten Proteinen, oder mit Proteinen aus Zellextrakten durchgeführt werden. Kurze DNA-Fragmente migrieren in einem nativen Polyacrylamidgel mit relativ hoher Geschwindigkeit zur Anode. Sind die DNA-Fragmente an ein Protein gebunden, so verlangsamt sich die Laufgeschwindigkeit deutlich (Retardierung). Zum Nachweis von DNA-Protein-Komplexen, wurden die Enden der DNA-Fragmente, wie unter **Kapitel 3.2.7** beschrieben, radioaktiv markiert. In einem Gesamtansatz von 20 µl mit dem zu untersuchenden Proteinextrakt, wurden ca. 25000 – 30000 cpm des radioaktiv markierten dsDNA-Oligonukleotids eingesetzt, sowie 10 µl EMSA-Bindpuffer. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf ein 20 x 20 cm und 1,5 mm dickes natives Polyacrylamidgel (5% Acrylamid in 0,5x TBE) aufgetragen. Der Gel-Lauf erfolgte bei 28 mA pro Gel mit 0,5x TBE als Laufpuffer. Die Laufstrecke konnte anhand der parallel aufgetragenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol verfolgt werden. Nach Beendigung des Laufes, wurde das Gel auf Whatman-Papier vakuumgetrocknet und anschließend über Nacht bei -80°C auf einem lichtempfindlichen Film mit Verstärkerfolie exponiert. Für den Nachweis bestimmter Proteine in einem DNA-Protein-Komplex wurden für das nachzuweisende Protein spezifische Antikörper (500ng-1µg) mit dem Lysat für 30 min vorinkubiert, bevor die Inkubation im Shift-Reaktionspuffer für weitere 30 min erfolgte. DNA-Protein-Antikörper-Komplexe können im Idealfall durch einen Supershift (zusätzlicher Komplex oberhalb des zu untersuchenden Signals), in einigen Ausnahmen auch durch eine Abnahme des zu untersuchenden Signals (Supershift-negativ: Antikörper bindet in der DNA-Bindungsdomäne oder verhindert die Dimerbildung des Transkriptionsfaktors).

3.3.10 Reportergergen Assay und Duale Luciferase Reaktion

Ein Reportergergen-Assay dient der funktionellen Analyse eines Promotors und der ihn regulierenden Transkriptionsfaktoren in der Zelle. Durch eine Transfektion eukaryontischer Zellen mit Reportergergen Konstrukten kann der Einfluss eines Stimulus oder eines Transkriptionsfaktors und seiner Bindungspartner auf die Genexpression quantifiziert werden. Dieses Konstrukt enthält dabei das zu analysierende DNA-Fragment (Promotor oder Transkriptionsfaktorbindesequenz) und diesem nachgeschaltet ein Reportergergen, dessen Expression quantifiziert werden kann. Auf diese Weise lässt sich die Aktivität an einem Promotor beziehungsweise die Aktivität eines Transkriptionsfaktors an einer Konsensussequenz indirekt bestimmen.

Die duale Luciferase Reaktion mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ der Firma Promega, basiert auf dem Einsatz zweier unterschiedlicher Vektoren. Ein Vektor, pGL2-Basic, der für die Klonierung des zu untersuchenden DNA-Fragmentes verwendet wird, enthält als Reportergergen die Firefly-Luciferase aus *Photinus pyralis*. Ein weiterer Vektor, pHRL-TK, enthält vor dem Gen der Renilla-Luciferase aus *Renilla reniformis* den Promotor der Thymidinkinase (TK) mit minimalen regulativen Elementen. Die Expression der Renilla-Luciferase steht dabei unter der Kontrolle eines konstitutiven Minimalpromotors und diente der internen Standardisierung der Transfektion. Beide Vektoren werden in eukaryontische Zellen ko-transfiziert. Frühestens nach etwa 24 Stunden werden die Zellen geerntet und in einem speziellen Passiv-Lysispuffer (Promega) lysiert. Lysate werden für 30 min auf dem Drehrad bei 4 °C rotiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Reportergergen Assays wurden verschiedene Varianten des *JUN* Promotors (siehe **Kapitel 2.6**) vor das Gen der Firefly-Luciferase in den Vektor pGL2-Basic kloniert und als Reportergergen Konstrukt für die Untersuchung der Expression von c-Jun verwendet. Die bei -80 °C gelagerten Lysate wurden auf Eis aufgetaut und zentrifugiert (5 min/3500 x g). Es wurden jeweils 3-5 µl des Zelllysates für die Luciferasemessung verwendet und Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zur Messung wurde das Mithras LB 940 (Berthold Technologies) verwendet.

Durch Ausnutzung der unterschiedlichen Substratspezifitäten von Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase kann man die Aktivität beider Luciferasen in einem Ansatz messen. Dabei enthält das Substratreagenz der Renilla-Luciferase einen Inhibitor für die Firefly-Luciferase, so dass es möglich ist die Emissionen beider Luciferasen, im selben Ansatz, zeitlich getrennt voneinander zu messen. Infolge der enzymatischen Umsetzung des jeweiligen Lumineszenz-Substrats kommt es jeweils zu einer Lichtemission, wobei das ausgesendete Licht proportional zur Luciferasemenge ist. Sowohl die Messung als auch die Quantifizierung erfolgten im Mithras LB 940 der Firma Berthold Technologies.

3.3.11 Analyse der Hodgkin-Zellüberstände mit dem RayBio® Human Inflammation Antibody Array

Das RayBio® Human Inflammation Antibody Array 3 der Firma RayBiotech Inc. ist eine Komplettlösung für die Analyse von verschiedenen Zytokinen in einer Mixtur. Sie basiert auf der Bindung der Zytokine über spezifische membrangebundene Antikörper an definierten Positionen an die Membran und dem anschließenden Immunologischen Nachweis über ebenfalls für das jeweilige Zytokin spezifische Antikörper (Sandwich). Die Membranen wurden für eine Stunde bei 4°C geblockt. Anschließend erfolgte deren

Inkubation mit konditionierten Kulturüberständen der verschiedenen Hodgkin-Zelllinien und Referenz-Zelllinien (jeweils 24 Stunden Kultur), bzw. Serum-haltiges Medium für den Zytokin-Hintergrund (ebenfalls 24 Stunden bei 37°C inkubiert), über Nacht für 14 Stunden bei 4°C. Hierbei kommt es zu einer Bindung des jeweiligen Antigens (Zytokin) an seinen spezifischen Antikörper auf der Membran. Die Kulturüberstände wurden dazu im Verhältnis 1:1 mit einer 2-fachen Blocklösung verdünnt. Nach der Dekantierung des Kulturüberstandes erfolgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer I und anschließend zweimaliges Waschen mit Waschpuffer II für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Membranen mit einem 1:250 verdünnten Cocktail von Biotin-konjugiertem Anti-Zytokin-Antikörper in Blockpuffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Waschen der Membranen erfolgte wie zuvor beschrieben mit den Waschpuffern I und II für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur. Nun folgte eine einstündige Inkubation mit einer 1:1000 verdünnten Lösung von HRP-konjugiertem Streptavidin in Blockpuffer. Die Membranen wurden abschließend abermals wie oben beschrieben gewaschen. Die Detektion erfolgte unter Verwendung der im Kit enthaltenen Zwei-Komponenten-Detektionslösungen, welche kurz vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur temperiert, im Verhältnis 1:1 gemischt, und für etwa 2 min mit den gewaschen Membranen inkubiert wurden. Die Exposition erfolgte mit Amersham Hyperfilm™ ECL für verschiedene Zeitpunkte. Die Auswertung der Intensitäten der jeweiligen Signale erfolgte densitometrisch unter Verwendung des Programms „ImageQuant-TL“ (NonLinear Dynamics Ltd.) nach Abzug des Hintergrundes, welcher durch die Serumproteine des Mediums verursacht wird.

4 Ergebnisse

4.1 Hohe konstitutive nukleäre AP-1 Aktivität in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien

Hodgkinzellen zeigen eine starke konstitutive NF- κ B und AP-1 Aktivität, die im EMSA nachweisbar ist (**Abbildung 6-A**). Durch Zellfraktionierung sollte untersucht werden, ob sich die Expressionshöhe und die Verteilung von Transkriptionsfaktoren der NF- κ B- und der AP-1 Familie zwischen Zytosol und Kern in den Hodgkinzellen von der in Vergleichszellen unterscheidet. Betrachtet man die Expression von AP-1 in den Hodgkinzellen (**Abbildung 6-B**), so fällt auf, dass c-Jun und JunB nicht nur stärker exprimiert werden, sondern auch nahezu ausschließlich im Kern lokalisiert sind. Auch JunD ist stärker in den Hodgkinzellen exprimiert, als in den Vergleichszellen, und reichert sich im Kern an. Das Hodgkin-spezifische Muster zeichnet sich besonders auffällig für die kleineren Isoformen dieses Proteins ab.

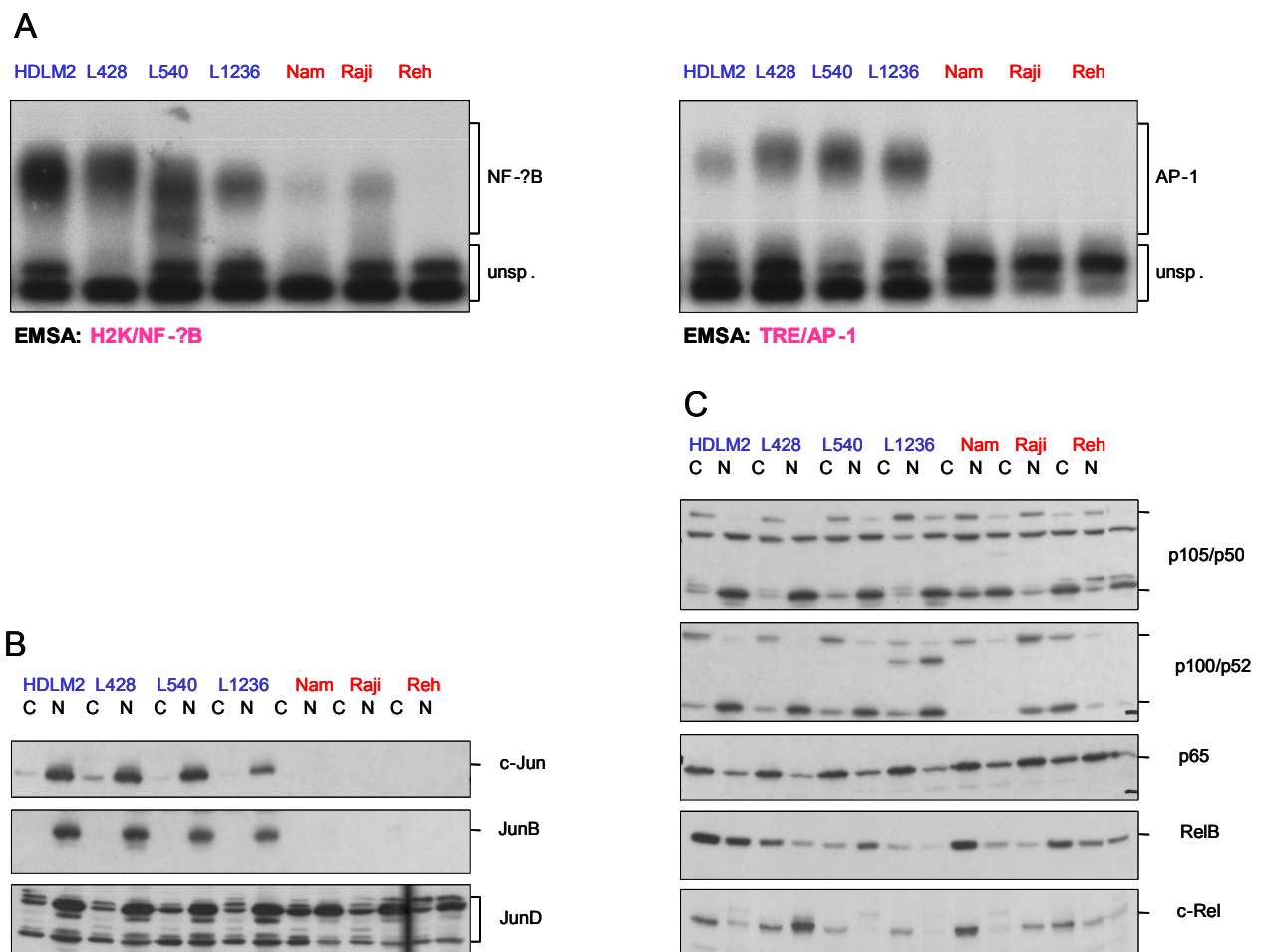


Abbildung 6: Kern-Zytoplasma-Fraktionierung verschiedener Lysate von Hodgkinzelllinien (blau) und Vergleichszelllinien (rot):

A: Darstellung der NF- κ B Aktivität (links) und der AP-1 Aktivität (rechts) im EMSA für Kernextrakte **B:** Analyse der Expression und Verteilung verschiedener Jun-Mitglieder der AP-1 Familie im Westernblot sowie von **C:** Faktoren der NF- κ B Familie. N = Kernextrakt; C = Zytoplasmaextrakt.

Die Lokalisierung der Vorläuferproteine p105 und p100 ist, wie zu erwarten, zytoplasmatisch, während die aktiven Transkriptionsfaktoren p50 und p52 vorwiegend im Kern zu finden sind (**Abbildung 6-C**). Für p65 zeichnet sich kein signifikanter Unterschied in der Expression des Proteins zwischen den Hodgkinzelllinien und den Vergleichszellen ab. Interessant und unerwartet ist hier aber die verstärkte Akkumulation von p65 im Zytoplasma und nicht im Kern. Die Proteine c-Rel und RelB zeigen sowohl in ihrer Expression Heterogenitäten zwischen den verschiedenen Zelllinien, als auch hinsichtlich ihrer Lokalisierung in der Kern- oder Zytoplasmafraktion. Ein Hodgkin-spezifisches Muster ist für diese beiden Proteine nicht zu erkennen. Diese Daten zeigen, dass p105 und p100 nicht nur permanent prozessiert werden, sondern dass die aktiven Transkriptionsfaktoren p50 und p52 offensichtlich die Hauptkomponente der konstitutiven NF- κ B Aktivität der Hodgkinzellen sind. Analysiert man die Extrakte von verschiedenen Hodgkinzelllinien mit denen von Vergleichszelllinien im Westernblot, so erkennt man eine anhaltende verstärkte proteolytische Prozessierung von p100 zu p52 in den Hodgkinzellen (**Abbildung 6-C**).

Bei der Vergleichszelllinie Raji handelt es sich um eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie, welche - wie aus **Abbildung 6-A** ersichtlich - ebenfalls eine persistente NF- κ B Aktivierung aufweist.

4.1.1 Erhöhte transkriptionelle Aktivität des *JUN* Promotors in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien

Ein Merkmal aller Hodgkinzellen ist ihre anhaltende AP-1 Aktivierung. Sie lässt sich nicht nur als erhöhte DNA-Bindeaktivität im EMSA nachweisen, sondern ist auch als erhöhte transkriptionelle Aktivität am *JUN* Promotor mit Hilfe von Luciferase-Testvektoren messbar. Für den Nachweis einer AP-1 Aktivität im EMSA wird für gewöhnlich eine spezielle AP-1/**TRE**-Konsensussequenz (**TPA-Responsive-Element**) aus dem Collagenase Promotor verwendet.

Eine Analyse des Effektes der AP-1 DNA-Bindungsaktivität auf die Transkription kann im Allgemeinen auch mit dieser Konsensussequenz (z.B. 6-fach TRE) erfolgen, welche zu diesem Zweck in einen Luciferase Testvektor kloniert wird. Für die Untersuchung der c-Jun Expression wurde anstelle dieser Konsensussequenz jedoch der *JUN* Promotor verwendet. Anhand unterschiedlich langer Promotorkonstrukte sollte im Luciferase-Assay geprüft werden, welche regulatorischen Elemente des *JUN* Promotors (**Abbildung 7-A**) für die Aktivierung der Transkription in Hodgkinzellen verantwortlich sind.

Mit Hilfe von Varianten dieser Promotorkonstrukte, bei dem die beiden AP-1 Bindesequenzen entweder einzeln oder zusammen mutiert sind, konnte gezeigt werden, dass AP-1 in Hodgkinzellen auf transkriptioneller Ebene aktiv ist, während im EMSA nur die Assemblierung eines AP-1 Komplexes mit der DNA nachgewiesen wird. Die Promotor-Varianten wurden dazu jeweils als regulierendes Element vor das Gen der Firefly-Luciferase in den Vektor pGL2-Basic kloniert und im dualen Luciferase Assay (DLA siehe **Kapitel 3.3.10**) für Hodgkinzellen und Referenzzellen analysiert (**Abbildung 7-B**). Die im Folgenden als Kurzform erwähnten Promotor Varianten WTK, WTL, Δ Jun1, Δ Jun2 und Δ Jun1+2 stehen jeweils für pGL2-c-JunPro-WTK, pGL2-c-JunPro-WTL, pGL2-c-JunPro- Δ Jun1, pGL2-c-JunPro- Δ Jun2 und pGL2-c-JunPro- Δ Jun1+2 (siehe auch **Kapitel 2.6**).

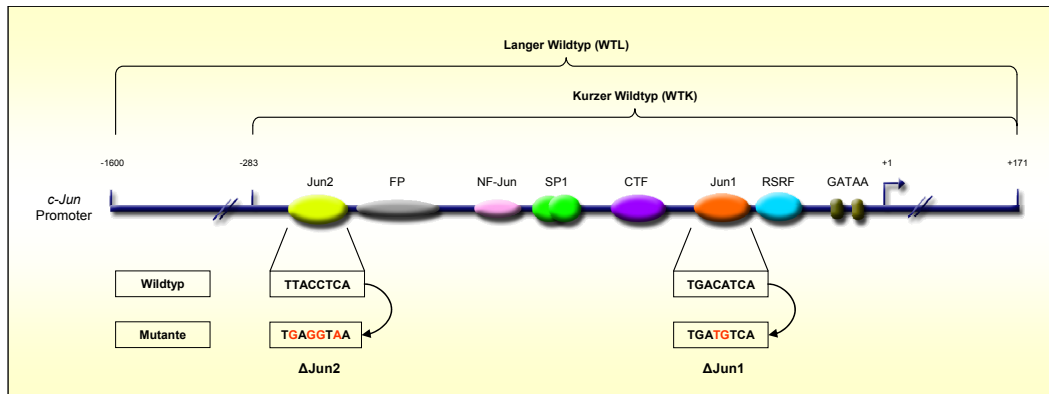
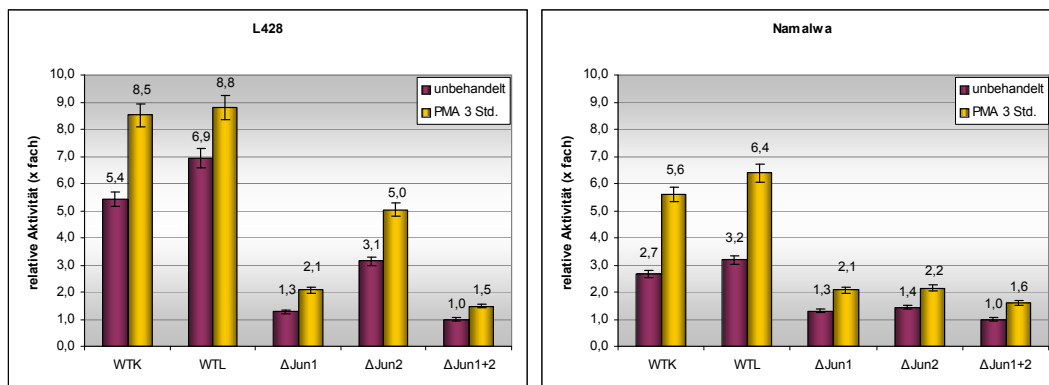
A**B**

Abbildung 7: Erhöhte Transkriptionsaktivität am *JUN* Promotor in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien:

A: Schematische Darstellung der Struktur des *JUN* Promotors: Dargestellt sind der kurze Wildtyp Promotor (-283 bis +171) sowie der lange Wildtyp Promotor (-1600 bis +171) mit den regulatorischen Sequenzen. Ebenfalls zu entnehmen sind die Modifikationen in den AP-1 Bindestellen in den mutierten Promotoren ΔJun1, ΔJun2 und ΔJun1+2. **B:** Persistente Aktivierung des *JUN* Promotors in Zellen des Hodgkin Lymphoms. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Luciferase-Aktivitäten aus drei unabhängigen Messungen bezogen auf das Konstrukt ΔJun1+2 im unstimulierten Zustand exemplarisch für die Hodgkinzelllinie L428 und die Referenzzelllinie Namalwa. Die Bezeichnungen ΔJun1, ΔJun2 und ΔJun1+2 beziehen sich auf die in Angel *et al.*, 1988 und van Dam *et al.*, 1995 beschriebenen CAT-Reporterkonstrukte.

Die Herstellung der verschiedenen Luciferase-Reporterkonstrukte erfolgte mittels PCR aus CAT-Reporterkonstrukten (pBLCAT5), welche uns freundlicherweise von Peter Angel zur Verfügung gestellt wurden (Angel, *et al.*, 1988; Stein, *et al.*, 1992; Herr, *et al.*, 1994; van Dam, *et al.*, 1995). Diese verschiedenen umklonierten Konstrukte wurden nun in Hodgkinzellen und Referenzzellen getestet. Ein Vorversuch wurde in HeLa Zellen im unstimulierten- und PMA-stimulierten Zustand (60 min), 24 Stunden nach Transfektion dieser Konstrukte, durchgeführt.

In der **Abbildung 7** sind die Resultate für die verschiedenen Promotorkonstrukte exemplarisch in der Hodgkinzelllinie L428 und in der Referenzzelllinie Namalwa im unstimulierten Zustand und aktiviert durch PMA dargestellt. Eine Quantifizierung, der im Folgenden dargestellten Daten, erfolgte auf Grundlage der gemessenen relativen Aktivitäten des Dual-Luciferase-Assays mit dem Mithras LB 940. Die basale Aktivität am kurzen Wildtyp-Promotor liegt in den Hodgkinzellen 2-fach höher als in den Vergleichszellen. Für den langen Wildtyp-Promotor liegt dieser Faktor mit 2,2-fach nur minimal höher als bei dem kurzen Wildtyp-

Promotor. Der Unterschied zwischen kurzem und langem Wildtyp-Promotor liegt in beiden Zelllinien bei einem Faktor von 1,2-fach. Werden die Zellen für drei Stunden mit PMA stimuliert, so beobachtet man in Namalwa sowohl für den kurzen als auch für den langen Wildtyp-Promotor eine 2-fache Induktion verglichen mit der Aktivität im unstimulierten Zustand. Für L428 liegt dieser Faktor bei 1,5-fach für den kurzen, und 1,2-fach für den langen Wildtyp-Promotor, korrelierend damit, dass hier bereits eine basal erhöhte AP-1 Aktivität vorliegt. Die Verwendung von modifizierten Promotorkonstrukten zeigt die Spezifität der beobachteten AP-1 Aktivität genauer. So beobachtet man eine komplette Reduktion der AP-1 Aktivität bei Inaktivierung der Jun1 Bindestelle (Δ Jun1) in beiden Zelllinien auf den Wert des Konstruktes Δ Jun1+2, in welchem beide AP-1 Bindestellen biologisch inaktiv sind. Wird hingegen die Bindestelle Jun2 mutiert (Δ Jun2), so wird zwar auch hier die AP-1-Aktivität in L428 reduziert, aber nur auf die Hälfte des Wertes des Wildtyp-Promotor-Konstruktes. In Namalwa hingegen beobachtet man keine Restaktivität für AP-1 am Konstrukt Δ Jun2. Aus diesem Versuch lässt sich schlussfolgern, dass die erhöhte Expression von c-Jun in den Hodgkinzellen im Wesentlichen auf eine anormale Aktivierung der Promotorregion von +1 bis -283 zurückzuführen ist. Die beiden AP-1-ähnlichen Bindemotive Jun1 und Jun2 spielen dabei eine entscheidende Rolle und es stellt sich die Frage welche Faktoren zu der erhöhten Aktivierung des *JUN* Promotors beitragen. Die Befunde dieses Experimentes dienen dabei als Grundlage für das Design eines synthetischen *JUN* Promotors, der zur Anreicherung einer Hodgkin-spezifischen DNA-Bindungsaktivität benutzt wurde (siehe **Kapitel 4.2**).

4.2 Anreicherung und Identifizierung einer Hodgkin-spezifischen DNA-Bindungsaktivität am *JUN* Promotor

Im Zusammenhang mit der permanenten Aktivierung von AP-1 in den Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen ist die positive Autoregulation des Transkriptionsfaktors c-Jun von besonderem Interesse. Angel und Kollegen (Angel, *et al.*, 1988) zeigten, dass die DNA Bindeaktivität von AP-1 bereits eine Stunde nach Stimulation mit PMA in HeLa oder HepG2 Zellen bis zu vierfach erhöht ist. Diese Zunahme wurde auch durch Vorinkubation der Zellen mit dem Translationshemmer Cycloheximid nicht inhibiert. Es wurde daraus geschlussfolgert, dass die Zunahme der c-Jun/AP-1 Aktivität in zwei Schritten erfolgt. Der erste Schritt, welcher unmittelbar nach der Stimulation mit PMA erfolgt, involviert ein posttranslationales Ereignis (Phosphorylierung), welches zu einer Zunahme der Aktivität bereits vorhandener AP-1 Moleküle führt. In einem späteren Schritt folgt dann eine verstärkte Synthese von c-Jun, vermittelt durch die Interaktion von aktiviertem c-Jun/AP-1 mit dem *JUN* Promotor. Die Transkription des *JUN* Gens wird damit durch sein eigenes Produkt stimuliert. Es stellt sich die Frage, ob andere Promotor-bindende Transkriptionsfaktoren mit c-Jun synergieren können oder eigenständig die erhöhte AP-1 Aktivität in Hodgkin-Zellen herbeiführen.

Eine Analyse der *JUN* Promotor-Sequenz mit dem Programm JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) nach zusätzlichen Bindemotiven ergab, dass sich in der Region -5 bis -33 eine klassische GATA Sequenz (Watt, *et al.*, 1990) befindet (siehe dazu auch *c-Jun* WT-Promotor in **Abbildung 9**). Extrakte verschiedener Hodgkinzelllinien und von Referenzzelllinien wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf die

Expression von GATA-1, GATA-2 und GATA-3 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass GATA-3 in den Hodgkinzellen eine erhöhte Expression (**Abbildung 8**) aufweist, während für die anderen untersuchten GATA-Faktoren keinen Unterschiede zwischen den Vergleichszellen und den Hodgkinzellen nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob diese erhöhte Expression von GATA-3 einen Einfluss auf den *JUN* Promotor hat, wurde für den EMSA die GATA-Sequenz (5'-AGCAGATAAGTGTGAGCTCGGGCTGGATAAGGGCT-3') aus dem *JUN* Promotor als radioaktiv markiertes Oligonukleotid verwendet.

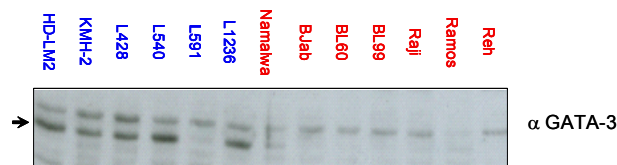


Abbildung 8: Erhöhte Expression von GATA3 in Zellen des Hodgkin Lymphoms:

Dargestellt sind Lysate verschiedener Hodgkinzelllinien (blau) und Vergleichszelllinien (rot). Mit Ausnahme von L591 wird GATA-3 (Antikörper GATA-3 (HG3-31)) in allen Hodgkinzelllinien höher exprimiert als in den Referenzzelllinien (untere Banden).

Die Extrakte der in **Abbildung 8** gezeigten Zelllinien, wurden ohne oder mit Antikörper gegen GATA-3 (Santa Cruz: HG3-31) für eine halbe Stunde bei 4 °C vorinkubiert und anschließend im EMSA-Shift Assay für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Ansätze auf das native Polyacrylamid-Gel geladen wurden. Die unterschiedliche Expression von GATA-3 zwischen Hodgkin- und Referenzzellen korrelierte allerdings nicht mit einer differenziellen Bindung an der GATA-Sequenz des *JUN* Promotors. Die DNA Bindungsaktivitäten aller Zelllinien waren vergleichsweise ähnlich stark. Auch in den Supershift-Ansätzen konnte kein zusätzliches Signal nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass GATA-3 nicht an die identifizierte GATA-Bindestelle im *JUN* Promotor bindet (EMSA-Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis der AP-1 Aktivität erfolgt für gewöhnlich unter Verwendung der AP-1/TRE Konsensussequenz (5'-TGAGTCA-3') im EMSA. Diese Konsensussequenz ist hinreichend für den allgemeinen Nachweis von Jun-, Fos- und ATF- Mitgliedern der AP-1 Familie. Möchte man jedoch die Wirkung der verschiedenen AP-1 Faktoren, oder die Zusammensetzung des AP-1 Komplexes an einen bestimmten Promotor untersuchen, so ist es notwendig die jeweiligen AP-1-Bindestellen des zu untersuchenden Promotors anstelle der AP-1/TRE Konsensussequenz zu verwenden, da diese in ihrer Sequenz oft geringfügig abweichen können. Das hat zur Folge, dass diese Bindestellen einen anders zusammengesetzten AP-1 Komplex binden können als die AP-1/TRE Konsensussequenz und dieses wiederum hat eine unmittelbare Auswirkung auf die transkriptionelle Aktivität des Promotors.

Der Promotor des *JUN* Gens enthält zwei verschiedene AP-1 Bindestellen. Jun1/AP-1 (Basen -63 bis -70; 5'-TGACATCA-3') bevorzugt die Bindung von Jun- und Fos-Mitgliedern der AP-1 Familie, während Jun2/AP-1 (Basen -182-189; 5'-TTACCTCA-3') Ähnlichkeit zu Sequenzen hat, die bevorzugt c-Jun and ATF-2(-ähnliche) Proteine binden (van Dam, *et al.*, 1993; Hayakawa, *et al.*, 2004; siehe dazu auch **Abbildung 7 und Abbildung 9**).

Für den Nachweis einer Hodgkin-Zell-spezifischen Bindeaktivität am *JUN* Promotor, wie auch für die Aufreinigung dieser Aktivität war es notwendig, ein DNA-Fragment zu finden, dass sowohl für den Einsatz als Oligonukleotid im EMSA geeignet ist, als auch als DNA-Fragment für die Kopplung an ein Trägermaterial, welches bei der Aufreinigung dieser Aktivität aus chromatographisch vorgereinigten Extrakten als Affinitätsmatrix verwendet wird. Bei dem Design des Oligonukleotides wurde in erster Linie Wert darauf gelegt, dass es im EMSA eindeutige Signale liefert, welche für die Hodgkinzellen spezifisch, und in den Referenzzellen nicht vorhanden sind. Im Prinzip können EMSA-Assays mit Promotorfragmenten von bis zu circa 300 bp durchgeführt werden (Scheidereit, *et al.*, 1987; Kawakami, *et al.*, 1988).

In Vorversuchen wurde ein 210 bp Fragment aus dem *JUN* WT-Promotor mittels PCR hergestellt, radioaktiv markiert, und mit Kernextrakten verschiedener Hodgkin- und Referenzzelllinien getestet. Das Ergebnis mit diesem Oligonukleotid zeigte jedoch keine Unterschiede in den Extrakten. Für eine Optimierung wurden daher Oligonukleotide der einzelnen Transkriptionsfaktor-Bindesequenzen einzeln im EMSA getestet. Es stellte sich heraus, dass die Bindeaktivitäten im EMSA für SP-1, NF-Jun, CTF, RSRF und die FP-Region für alle getesteten Extrakte von Hodgkin- und Referenzzelllinien in ihren Signalstärken etwa gleich stark waren (Daten nicht gezeigt). Es wurde weiterhin festgestellt, dass die Bindeaktivität für SP-1 und CTF relativ stark im Vergleich zu allen anderen Aktivitäten war. Die Oligonukleotide Jun1 und Jun2 hingegen zeigten wie erwartet Unterschiede zwischen den Hodgkin- und Referenzzelllinien. Da das 210 bp Fragment für den EMSA ungeeignet war, sollte nun ein synthetischer Promotor hergestellt werden. Es wurde dabei Wert darauf gelegt, dass dieser Promotor möglichst kurz ist, aber doch alle essentiellen Bindesequenzen enthält. Aus diesem Grund wurde auf große Bereiche der Regionen zwischen den ermittelten Transkriptionsfaktor-Bindestellen verzichtet (Angel, *et al.*, 1988; Herr, *et al.*, 1994). Die ausgewählten Bindestellen entsprachen in ihrer Reihenfolge dem WT-Promotor und befanden sich, bis auf eine kurze Linkerregion, jeweils in direkter Nachbarschaft zueinander. Die Bindestellen SP-1 und CTF wurden aus den oben genannten Gründen nicht mit in den synthetischen Promotor aufgenommen. Ebenfalls verzichtet wurde auf die identifizierte GATA-Sequenz. Der synthetische *JUN* Promotor „JunPro78“ ist in **Abbildung 9** dargestellt.

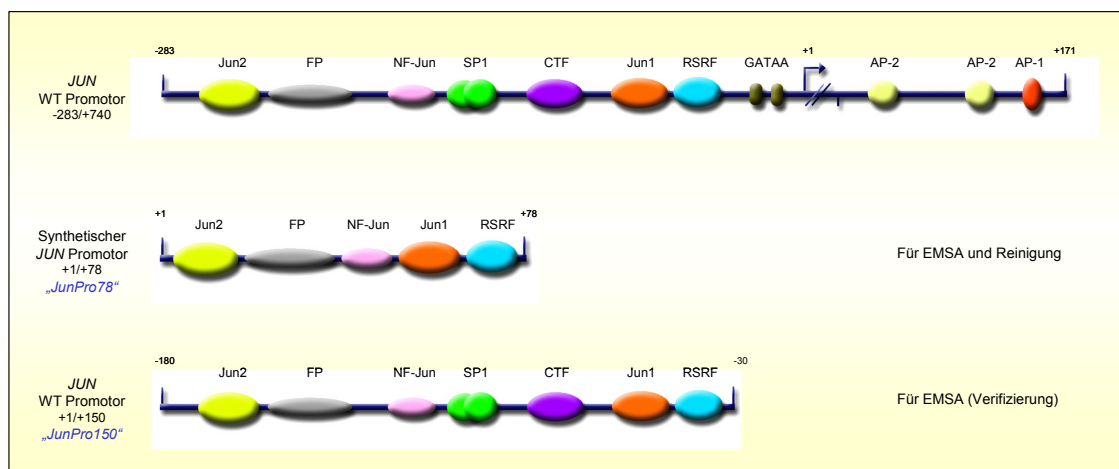


Abbildung 9: Schematische Darstellung des *JUN* Promotors (oben) mit seinen bekannten Transkriptionsfaktorbindestellen:

Abgeleitet aus dem Wildtyp-Promotor entstanden der synthetische Promotor „JunPro78“ (*mitte*) für den Nachweis und die Aufreinigung Hodgkin-spezifischer DNA-bindender Faktoren im *JUN* Promotor und der *JUN* WT-Promotor „JunPro150“ für die Verifizierung der erhaltenen Daten mit „JunPro78“ (*unten*). Vergl. auch **Abbildung 7-A**.

Die EMSA-Ergebnisse mit dem synthetischen DNA-Fragment sind in **Abbildung 10** dargestellt und zeigen eine selektiv in Hodgkin-Zellen vorkommende DNA Bindungsaktivität, die aus den zwei ähnlich migrierenden Komplexen C4 und C5 besteht (roter Rahmen). Um sicherzustellen, dass dieser Unterschied nicht auf einen Fehler beim Design des Oligonukleotides zurückzuführen ist (zufälliges Entstehen einer neuen Bindestelle) wurden die Ergebnisse aus diesem Experiment zusätzlich mit dem WT-Promotor „JunPro150“ (**Abbildung 9**) verifiziert (Daten nicht gezeigt). Dieser ist eine exakte Kopie des Wildtyp-Promotors, begrenzt auf die Region zwischen Jun2 und RSRF, und diente ausschließlich zur Bestätigung der Ergebnisse mit „JunPro78“. Der synthetische Promotor „JunPro78“ wurde für die Verwendung im EMSA und für die Aufreinigung einer Hodgkin-spezifischen DNA-Bindungsaktivität am *JUN* Promotor verwendet. In den folgenden Abschnitten wird die Anreicherung und Analyse der Hodgkin-Zell-spezifischen Bindeaktivität am *JUN* Promotor beschrieben.

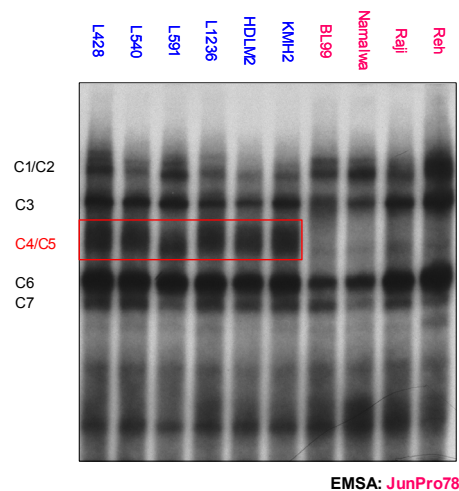


Abbildung 10: Vergleich der Kernextrakte verschiedener Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen (blau) und verschiedener Vergleichszellen im EMSA mit dem synthetischen *JUN* Promotor Fragment „JunPro78“:

Der rot markierte Bereich (Komplexe C4/C5) zeigt deutlich die Hodgkin-spezifische Bindeaktivität am *JUN* Promotor (freie DNA nicht gezeigt).

4.2.1 Aufreinigung eines Hodgkin Zell-spezifischen Proteininteraktion am *JUN* Promotor

Für die Aufreinigung von Proteinen, die am *JUN* Promotor binden, wurden jeweils 100 mg Kernextrakte der Hodgkin Lymphom Zelllinie L428 und der Burkitt Lymphom Zelllinie Namalwa verwendet. Diese Extrakte wurden auf eine Ionenstärke von 420 mM mit NaCl eingestellt und für die Entfernung von Nukleinsäuren über eine DE-52 Anionenaustauscher Säule gereinigt. Das Säulenvolumen betrug hier 20 ml und die Flussrate wurde auf 1 ml/min eingestellt. Diese hohe Ionenstärke gewährleistet, dass Nukleinsäuren von der Säule gebunden werden, während sich in der Durchlaufraktion der vorgereinigte Protein-Extrakt für die folgenden Chromatographieschritte befindet (DE-52-Pool). Der Pool wurde im Anschluss für 8 Stunden

mit zweimaligem Pufferwechsel gegen 4 Liter BC50-Puffer dialysiert. Die nun folgenden Anreicherungsprozeduren sind in den **Kapiteln 4.2.1.1 bis 4.2.1.4** aufgeführt.

4.2.1.1 Auftrennung durch Kationenaustauscherchromatographie an SP-Sepharose

Der dialysierte DE-52-Pool (40 ml) von L428- und Namalwa-Zellen wurde jeweils auf eine mit BC50-Puffer voräquilibrierte SP-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule (HiPrep 16/10; Bettvolumen: 20 ml) wurde dann mit 5-10 Volumina Äquilibrationpuffer (BC50) gewaschen, bis die Absorptionswerte bei 280 nm eine stabile Grundlinie aufwiesen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 50 mM KCl (BC50) auf 500 mM KCl (BC500) innerhalb von 30 Minuten. Es wurden Fraktionen von 1 ml bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min gesammelt. Jeweils 2 µl jeder Fraktion wurden im EMSA auf Bindeaktivität getestet. Die Fraktionen mit der auffälligen Hodgkin-spezifischen Bindeaktivität wurden jeweils vereinigt (SP-Sepharose-Pool). Die aktiven Fraktionen eluierten in einem Bereich zwischen 75 mM und 230 mM KCl wobei das Maximum bei 180 mM KCl lag. Bei den Namalwa-Fraktionen, welche nicht die Hodgkin-Zell-spezifische Bindeaktivität aufweisen, wurden genau dieselben Fraktionsnummern wie bei L428 zu einem Pool vereinigt. **Abbildung 11** zeigt das Ergebnis der beiden Auftrennungen an SP-Sepharose im EMSA.

Wie aus dieser Abbildung ersichtlich ist, befand sich im Durchlauf (DL) der L428 Probe noch ziemlich viel Restaktivität. Aus diesem Grund wurde der Durchlauf, sowohl von L428, als auch von Namalwa, unter den gleichen Bedingungen rechromatographiert, die aktiven Fraktionen bestimmt, und mit dem Pool der jeweils vorhergehenden Chromatographie vereinigt. Der SP-Sepharose-Pool wurde für 8 Stunden mit zweimaligem Pufferwechsel gegen 4 Liter BC50-Puffer dialysiert.

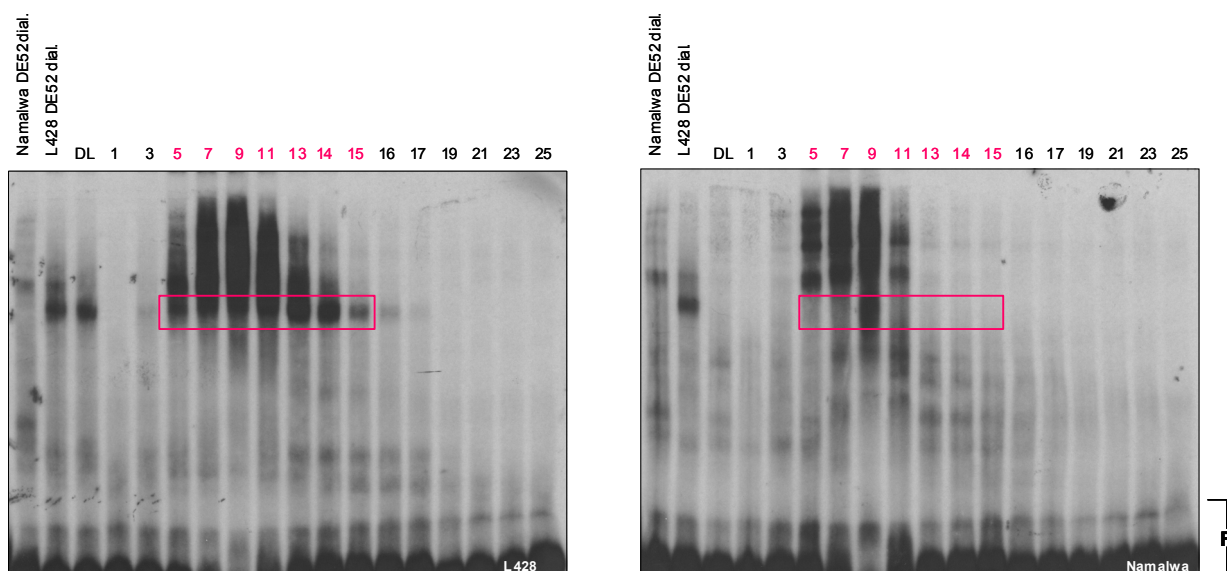


Abbildung 11: Darstellung des dialysierten DE-52-Pools aus L428 und Namalwa nach Auftrennung an SP-Sepharose im EMSA: Dargestellt sind neben den einzelnen Fraktionen der Durchlauf (DL) und der jeweilige dialysierte DE-52 Pool. Der rot markierte Bereich der Fraktionen 5 bis 15 wurde vereinigt, dialysiert und als Ausgangsmaterial für den nächsten Reinigungsschritt verwendet (L428/*links* und Namalwa/*rechts*). F = freie DNA

4.2.1.2 Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose

Der dialysierte SP-Sepharose-Pool (20 ml) von L428- und Namalwa-Zellen wurde auf eine mit BC50-Puffer äquilibrierte Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Heparin-Sepharose ist in erste Linie eine Affinitäts-Matrix für die Reinigung von Koagulationsfaktoren, Lipasen, Wachstumsfaktoren, Steroid-Rezeptoren, DNA-bindenden Proteinen und Lipoproteinen. Bei der Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen simuliert das polymere Heparin die polyanionische Struktur von Nukleinsäuren.

Die Säule (HiPrep 16/10; Bettvolumen: 20 ml Heparin-Sepharose™ 6 Fast Flow) wurde dann mit 5-10 Volumina Äquilibrierungspuffer (BC50) gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 50 mM KCl (BC50) auf 500 mM KCl (BC500) innerhalb von 60 Minuten. Das Fraktionsvolumen betrug 1 ml bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die Bindeaktivität wurde im EMSA mit 2 µl jeder Fraktion getestet und die aktiven Fraktionen jeweils vereinigt (Heparin-Sepharose-Pool). Für den Pool der Namalwa-Fraktionen wurden dieselben Fraktionsnummern ausgewählt wie bei L428, da in allen Reinigungsschritten angestrebt wurde, dass die Trennungsläufe unter nahezu identischen Bedingungen ablaufen. Die **Abbildung 12** zeigt das Ergebnis der beiden Auftrennungen an Heparin-Sepharose im EMSA.

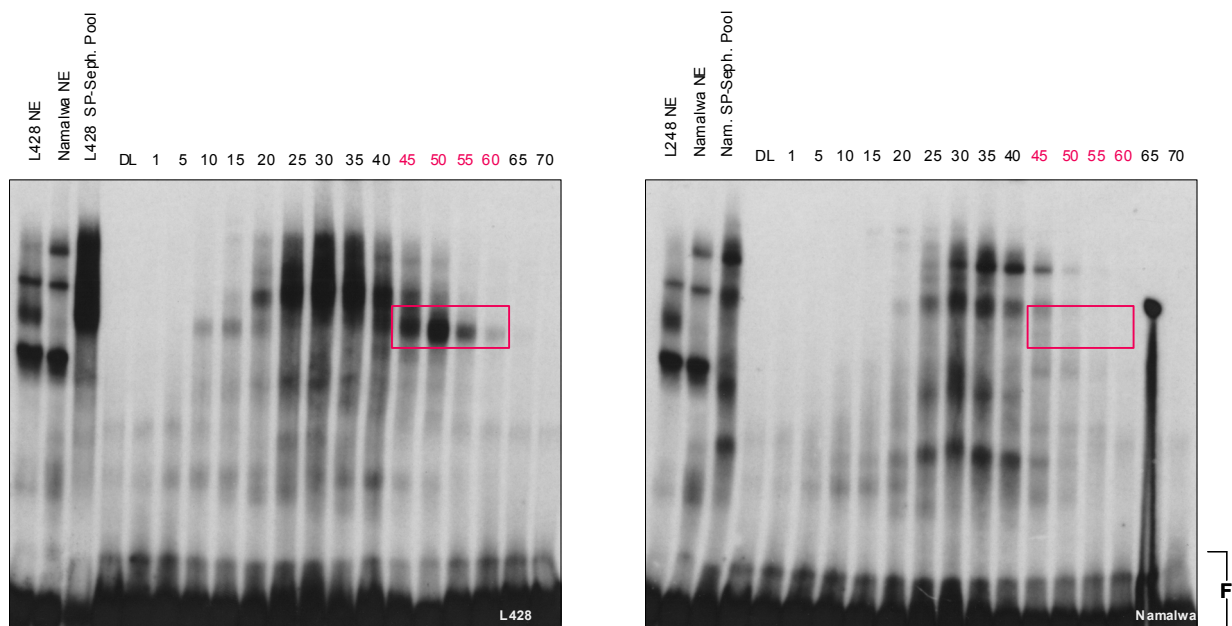


Abbildung 12: Darstellung des dialysierten SP-Sepharose-Pools aus L428 und Namalwa nach Auftrennung an Heparin-Sepharose im EMSA:

Dargestellt sind neben den einzelnen Fraktionen der Durchlauf (DL) und der jeweilige dialysierte SP-Sepharose-Pool sowie Kernextrakte beider Zelllinien. Der rot markierte Bereich der Fraktionen 45 bis 60 wurde vereinigt, dialysiert und als Ausgangsmaterial für den nächsten Reinigungsschritt verwendet (L428/links und Namalwa/rechts). F = freie DNA

Die aktiven Fraktionen eluierten in einem Bereich zwischen 340 mM und 450 mM KCl wobei das Maximum bei 375 mM KCl lag. Der Heparin-Sepharose-Pool wurde für 8 Stunden mit zweimaligem Pufferwechsel gegen 4 Liter BC50-Puffer + 0,03% NP-40 dialysiert.

4.2.1.3 Affinitätschromatographie an doppelsträngiger DNA-Cellulose

Der Heparin-Sepharose-Pool enthält neben DNA-bindenden Proteinen noch eine Vielzahl anderer Proteine. Der Reinigungsschritt an doppelsträngiger DNA-Cellulose soll zu einer Anreicherung der Proteine führen, welche allgemein an DNA binden können. Andere Proteine werden von diesen weitgehend getrennt. Der dialysierte Heparin-Sepharose-Pool (17 ml) von L428- und Namalwa-Zellen wurde jeweils auf eine mit BC50-Puffer + 0,03% NP-40 äquilibrierte DNA-Cellulose-Säule aufgetragen. Die Säule (Tricorn 5/20: Länge 20 mm, Durchmesser: 5 mm; Bettvolumen: 1 ml) wurde zuvor mit 10 Volumina Äquilibrationpuffer (BC50 + 0,03% NP-40) gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 50 mM KCl (BC50 + 0,03% NP-40) auf 1000 mM KCl (BC1000 + 0,03% NP-40) innerhalb von 180 Minuten. Das Fraktionsvolumen betrug 600 µl bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 60 µl/min. Die Bindeaktivität wurde im EMSA mit 2 µl jeder Fraktion getestet und die aktiven Fraktionen jeweils vereinigt (DNA-Cellulose-Pool). Auch hier erfolgte die Auswahl der Fraktionen des DNA-Cellulose-Pools von Namalwa auf Grundlage der aktiven L428 Fraktionen (**Abbildung 13**).

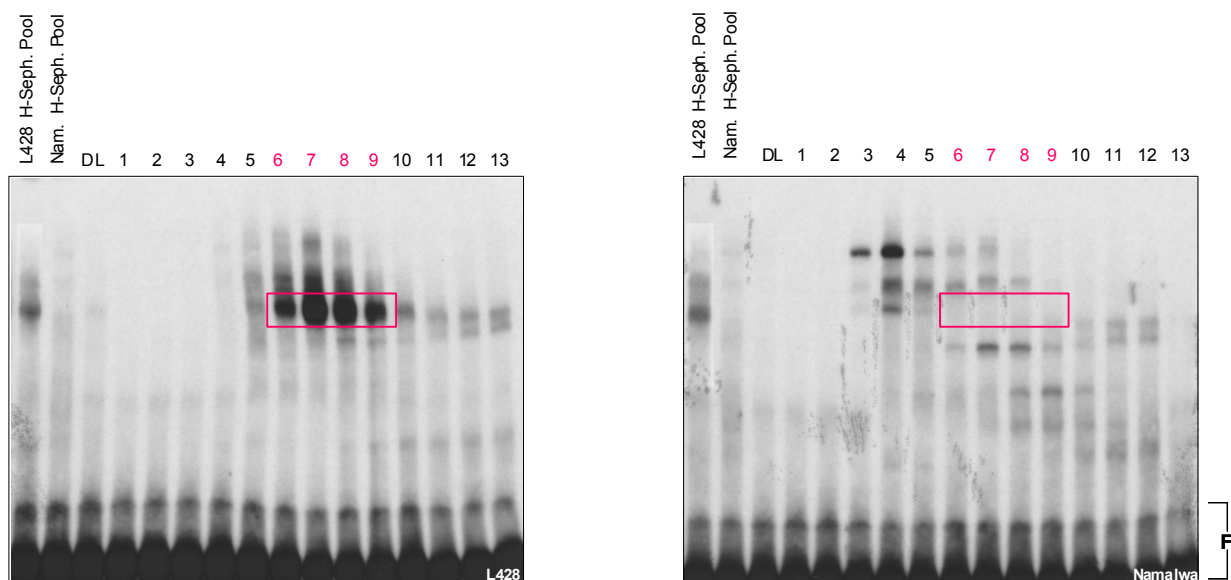


Abbildung 13: Darstellung des dialysierten Heparin-Sepharose-Pools aus L428 und Namalwa nach Auftrennung an doppelsträngiger DNA-Cellulose:

Dargestellt sind neben den einzelnen Fraktionen der Durchlauf (DL) und der jeweilige dialysierte Heparin-Sepharose-Pool beider Zelllinien. Der rot markierte Bereich der Fraktionen 6 bis 9 wurde vereinigt, dialysiert und als Ausgangsmaterial für den nächsten Reinigungsschritt verwendet (L428/*links* und Namalwa/*rechts*). F = freie DNA

Die aktiven Fraktionen eluierten in einem Bereich zwischen 320 mM und 475 mM KCl, wobei das Maximum bei 360 mM KCl lag. Der jeweilige DNA-Cellulose-Pool wurde für 8 Stunden mit zweimaligem Pufferwechsel gegen 4 Liter BC50-Puffer + 0,03% NP-40 dialysiert.

4.2.1.4 Affinitätschromatographie am doppelsträngigen *JUN* Promotorfragment „JunPro78“, gekoppelt an CNBr-aktivierter Sepharose

Für die Herstellung des Säulenmaterials wurde der synthetische doppelsträngige *JUN* Promotor „JunPro78“ kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose™ 4 Fast Flow gekoppelt. Die Kopplungsrate betrug etwa 35 % und wurde photometrisch bei 260 nm aus dem DNA-Gehalt der Kopplungslösung vor und nach der Kopplungsreaktion bestimmt. Das Ziel dieses Reinigungsschrittes ist es, von der Gesamtheit aller DNA-bindenden Proteine aus dem DNA-Cellulose-Pool die anzureichern, welche spezifisch an den *JUN* Promotor binden. Der dialysierte DNA-Cellulose-Pool (2,5 ml) von L428- und Namalwa-Zellen wurde jeweils auf eine mit BC50-Puffer + 0,03% NP-40 äquilibrierte JunPro78-Sepharose-Säule aufgetragen.

Die Säule (Tricorn 5/20: Länge 20 mm, Durchmesser: 5 mm; Bettvolumen: 1 ml) wurde zuvor mit 10 Volumina Äquilibrationpuffer (BC50 + 0,03% NP-40) gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 50 mM KCl (BC50 + 0,03% NP-40) auf 1000 mM KCl (BC1000 + 0,03% NP-40) innerhalb von 120 Minuten. Das Fraktionsvolumen betrug 120 µl bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 120 µl/min. Die DNA-Bindeaktivität wurde im EMSA mit 2 µl jeder Fraktion getestet und die aktiven Fraktionen jeweils vereinigt (JunPro78-Sepharose-Pool). Wie auch in den vorangegangenen Reinigungsschritten erfolgte die Auswahl der Fraktionen des JunPro78-Sepharose-Pools von Namalwa auf Grundlage der aktiven L428 Fraktionen.

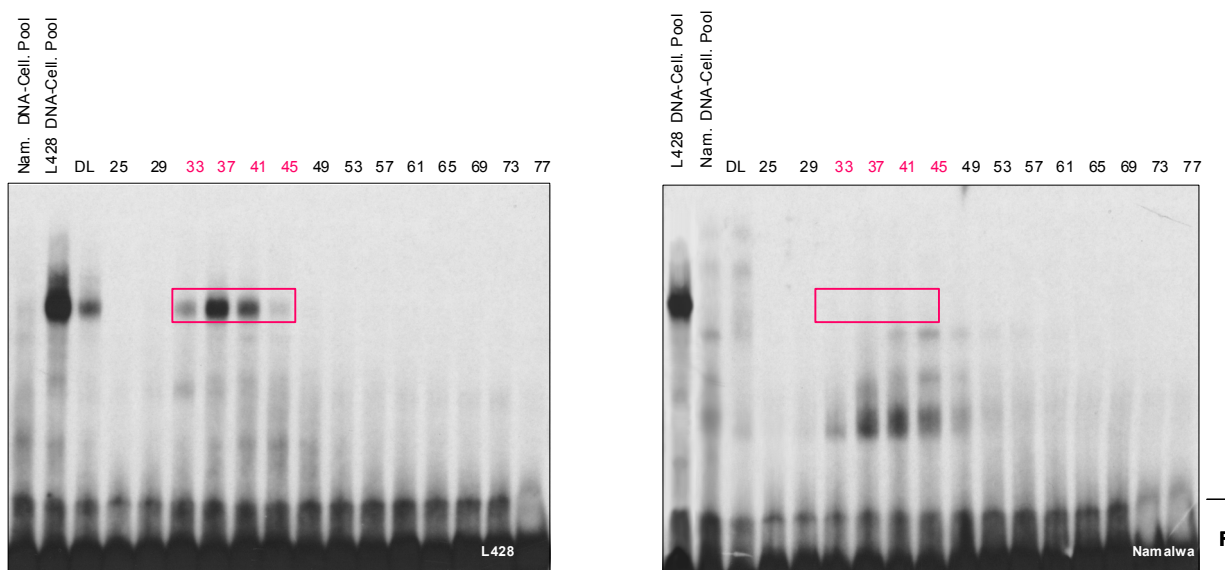


Abbildung 14: Darstellung des dialysierten DNA-Cellulose-Pools aus L428 und Namalwa nach Auftrennung an doppelsträngiger JunPro78-Sepharose im EMSA:

Dargestellt sind neben den einzelnen Fraktionen der Durchlauf (DL) und der jeweilige dialysierte DNA-Cellulose-Pool beider Zelllinien. Der rot markierte Bereich der Fraktionen 32 bis 45 wurde vereinigt und dialysiert (L428/links und Namalwa/rechts). F = freie DNA

Die **Abbildung 14** zeigt die Analyse der an JunPro78-Sepharose angereicherten Fraktionen von L428 und Namalwa im EMSA. Die aktiven Fraktionen eluierten in einem Bereich zwischen 250 mM und 360 mM KCl

wobei das Maximum bei 295 mM KCl lag. Der jeweilige JunPro78-Sepharose-Pool (1,5 ml) wurde für 8 Stunden mit zweimaligem Pufferwechsel gegen 4 Liter BC50-Puffer dialysiert.

Über fünf verschiedene chromatographische Schritte konnte also eine für Hodgkinzellen spezifische DNA-Bindeaktivität am *JUN* Promotor aus Kernextrakten angereichert werden, die aufgrund ihrer breiten Migration im EMSA zuvor als Komplex C4/C5 bezeichnet wurde (vgl. **Abbildung 10**).

4.2.2 Die am *JUN* Promotor gereinigten Hodgkin-Zell-spezifischen Fraktionen bestehen aus Komponenten der NF- κ B- und AP-1-Familien

Für eine Analyse der partial gereinigten Fraktionen mittels Massenspektrometrie (MS) wurden die verschiedenen chromatographischen Pools aus Namalwa und L428 über Nacht bei 80 mA und 4°C auf einem 20×20 cm großen SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteinbanden (**Abbildung 15**) erfolgte mittels MS-kompatibler kolloidaler Coomassie-Färbung (Imperial™ Protein Stain). Ausgewählte Banden, welche einen eindeutigen Unterschied zwischen L428 und Namalwa aufwiesen, wurden aus dem Gel isoliert und von Dr. Albrecht Otto und Dr. Eva-Christina Müller mittels LC-MS/MS (Tandem MS) massenspektrometrisch analysiert. Hierbei wurden Banden in L428 Zellfraktionen ausgewählt, die in Namalwa Fraktionen entweder nicht oder stark reduziert vorkamen.

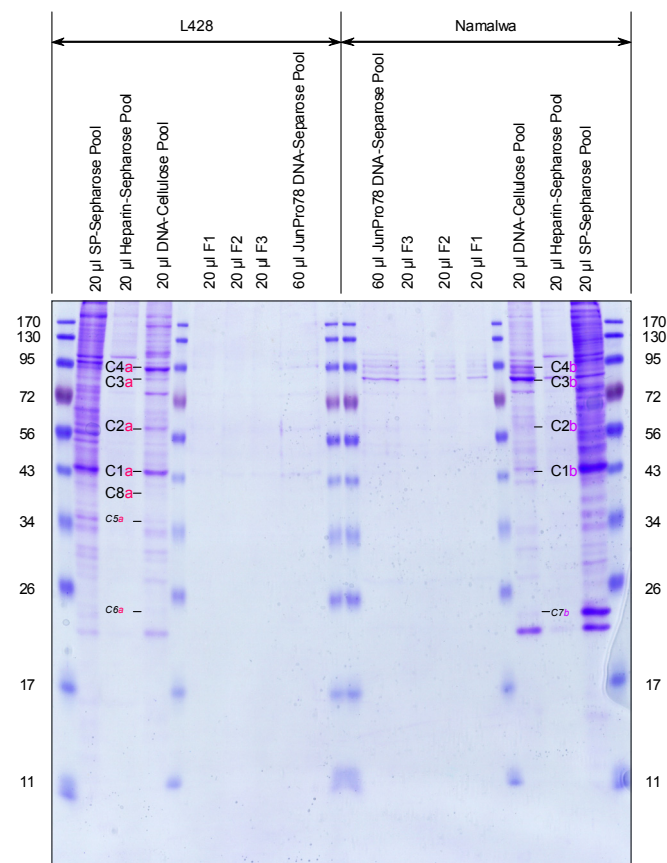


Abbildung 15: Auftrennung der gereinigten Pools mittels Gelelektrophorese für die LC-MS/MS Analyse:

20 µl des jeweiligen Pools wurden auf das Gel aufgetragen. Für die letzte Reinigungsstufe wurden jeweils 20 µl der einzelnen Peak-Fractionen und 60 µl des Gesamtpools auf das Gel geladen und aufgetrennt. Es wurden jeweils korrespondierende Regionen von L428 und Namalwa aus dem Gel isoliert (Bsp. C1a und C1b), sofern Unterschiede in der Bandenintensität beobachtet wurden oder nur in einer Zelllinie eine Bande beobachtet wurde. Die hier verwendete C-Nomenklatur ist nicht identisch mit der in **Abbildung 10** verwendeten.

Für die Analyse mittels LC-MS/MS wurden die markierten Proteinbanden des DNA-Cellulose-Pools ausgewählt, welche eine Referenzbande in der Bahn des JunPro78-Sepharose-Pools im Gel aufwies, da die Proteinmenge der Banden für den JunPro78-Sepharose-Pools für die massenspektrometrische Analyse nicht ausreichend gewesen wäre. In **Tabelle 1** sind die Daten der massenspektrometrischen Analyse zusammengefasst. Die hier aufgeführten Daten stellen nur eine Auswahl der Faktoren dar, die in einen engeren Zusammenhang mit AP-1 oder NF- κ B, hinsichtlich beispielsweise Interaktion, Funktion, Expression oder Regulation, gebracht werden konnten. Dargestellt sind für die jeweilige isolierte Gel-Bande die Namen der identifizierten Proteine, deren Peptide ein statistisch signifikantes Signal lieferten.

Tabelle 1: Ausgewählte Ergebnisse der Analyse mittels LC-MS/MS:

Dargestellt sind die jeweils analysierte Bande, die Kurzbezeichnung des gefundenen Proteins, dem ein analysiertes Peptid zugeordnet wurde, die Protein-ID (UniProtKB/Swiss-Prot) und die Bezeichnung des Proteins. Rot markierte Einträge wurden in der Literatur als mögliche direkte oder indirekte Interaktoren mit AP-1 Proteinen beschrieben und sind im Folgenden näher charakterisiert worden. Blau markierte Einträge sind NF- κ B Faktoren und hellblau markierte Einträge sind AP-1- und ATF- Proteine.

Bande:	Protein:	ID:	Name:
1a	DEK_HUMAN IRF4_HUMAN	P35659 Q15306	Protein DEK Interferon regulatory factor 4 (IRF-4)
2a	HDAC1_HUMAN DDX5_HUMAN	Q13547 P17844	Histone deacetylase 1 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
3a	TOP1_HUMAN DDX21_HUMAN UBF1_HUMAN TF3C4_HUMAN	P11387 Q9NR30 P17480 Q9UKN8	DNA topoisomerase I Nucleolar RNA helicase 2 Nucleolar transcription factor 1 Upstream binding factor 1 General transcription factor 3C polypeptide 4
4a	U2AF2_HUMAN	P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit
5a	RFC3_HUMAN ATF1_HUMAN JUND_HUMAN REL_HUMAN WDR57_HUMAN NFKB2_HUMAN AIM2_HUMAN	P40938 P18846 P17535 Q04864 Q96DI7 Q00653 O14862	Activator 1 38 kDa subunit Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-1 Transcription factor JunD c-Rel proto-oncogene protein WD-repeat protein 57 (38 kDa splicing factor) Nuclear factor NF-kappa-B p100/p52 Interferon-inducible protein AIM2 (cytoplasm)
6a	BCAS2_HUMAN ATF3_HUMAN	O75934 18847	Breast carcinoma amplified sequence 2 Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3
8a	JUNB_HUMAN ILF2_HUMAN TADBP_HUMAN DEK_HUMAN TIA1_HUMAN JUND_HUMAN JUN_HUMAN HDGF_HUMAN CAF1B_HUMAN	P17275 Q12905 Q13148 P35659 P31483 P17535 P05412 P51858 Q13112	Transcription factor JunB Interleukin enhancer-binding factor 2 TAR DNA-binding protein 43 Protein DEK Nucleolysin TIA-1 isoform p40 Transcription factor JunD Transcription factor c-Jun Hepatooma-derived growth factor HMG1L2 Heparin-binding protein Chromatin assembly factor 1 subunit B

Im folgenden Absatz wird auf einige der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine eingegangen, für die versucht wurde, ihre Interaktion mit dem *JUN* Promotor durch weitere Experimente zu bestätigen.

IRF-4:

Dieser Transkriptionsfaktor wurde in Bande 1a identifiziert. Die Expressionsanalyse von IRF-4 mittels Westernblot zeigte, dass dieser Faktor in Hodgkinzellen höher als in den Referenzzelllinien exprimiert wird. Die transiente Herunterregulation von IRF-4 mittels siRNAs zeigte keinen Effekt auf die Expression von c-

Jun. Eine Protein-Protein-Interaktion von IRF-4 und c-Jun konnte in Koimmunpräzipitationsexperimenten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

DEK:

Ein weiteres Protein, welches in Bande 1a, wie auch in Bande 8a, zu finden war, ist das Proto-Onkogen DEK. Hierbei handelt es sich um ein Chromatin-assoziiertes Protein mit einer Größe von 43 kDa. Die Expressionsanalyse ergab keine Unterschiede zwischen den Hodgkinzelllinien und den Vergleichszellen. Eine direkte Interaktion mit c-Jun konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. Dieses Protein besitzt zwei DNA-Bindungs-Domänen, eine sequenzspezifische Bindung an die DNA ist jedoch bisher nicht beschrieben worden. Von Cavellan und Kollegen (Cavellan, *et al.*, 2006) wurde eine Interaktion von DEK mit dem ebenfalls hier angereicherten Ddx21 beschrieben.

Ddx21:

In Bande 3a wurde unter anderem die RNA Helikase Ddx21 (Synonyme: RNA Helicase II/Gu α , DEAD Box Protein 21) identifiziert. Interessanterweise wird neben einer Interaktion von Ddx21 mit dem in Bande 1a identifizierten Protein DEK (Cavellan, *et al.*, 2006), auch eine Interaktion mit c-Jun beschrieben (Westermarck, *et al.*, 2002; Holmstrom, *et al.*, 2008; Mialon, *et al.*, 2008). Die Expressionsanalyse für Ddx21 zeigte keinen Unterschied zwischen Hodgkin- und Referenzzelllinien. Im Koimmunpräzipitationsexperiment wurden zwei verschiedene kommerzielle Antikörper gegen c-Jun verwendet, um eine Koimmunpräzipitation von Ddx21 zu erreichen. Ein Antikörper war spezifisch gegen den N-Terminus gerichtet, der andere gegen den C-Terminus von c-Jun. Es wurde ebenfalls ein Antikörper gegen Ddx21, für die Koimmunpräzipitation von c-Jun, eingesetzt. Eine physikalische Interaktion von c-Jun mit Ddx21 konnte weder in L428 noch in Namalwa nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

ILF-2:

Ebenfalls identifiziert wurde ILF-2 in Bande 8a als ein potentieller Faktor, welcher mit dem *JUN* Promotor interagiert. Hierbei handelt es sich um das Protein NF-45 (ein Synonym von ILF-2), der 45 kDa Untereinheit von NFAT (Nukleärer Faktor Aktivierter T-Zellen; Corthesy und Kao, 1994; Kao, *et al.*, 1994; Guan, *et al.*, 2008). Der Transkriptionsfaktor NFAT ist ein Heterodimer aus dem 45 kDa Protein NF-45 (ILF-2) und dem 90 kDa Protein NF-90 (ILF-3), welcher in die Expression von IL-2 in T-Zellen involviert ist (Corthesy und Kao, 1994). Interessant ist, dass NFAT mit c-Jun/c-Fos Heterodimeren an der DNA interagiert (Jain, *et al.*, 1993; Kim, *et al.*, 2000). Die Expressionsanalyse von ILF-2 zeigte keinen Unterschied zwischen Hodgkin- und Referenzzelllinien. Eine Interaktion mit c-Jun konnte nicht im Koimmunpräzipitationsexperiment nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

JunD und ATF-1:

In Bande 5a wurden die AP-1/ATF Transkriptionsfaktoren JunD und ATF-1 identifiziert. Von JunD ist bereits bekannt, dass dieses Protein Teil der konstitutiven AP-1 Aktivität der Hodgkinzellen ist und in diesen

Zellen auch überexprimiert wird. Für ATF-1 ergab die Expressionsanalyse keinen signifikanten Unterschied zwischen Hodgkin- und Referenzzelllinien.

ATF-3:

In Bande 6a wurde das Protein ATF-3 identifiziert. Hier ergab die Expressionsanalyse, dass dieses Protein in Hodgkinzellen stark überexprimiert wird. Auf diesen Transkriptionsfaktor wird in **Kapitel 4.3** genauer eingegangen.

c-Jun, JunB und JunD:

Die Bande 8a enthielt, neben dem oben erwähnten ILF-2, ebenso Peptide der Transkriptionsfaktoren c-Jun, JunB und JunD. Neben JunD sind auch die anderen beiden Proteine als Teil der konstitutiven AP-1 Aktivität der Hodgkinzellen bekannt und werden in diesen stark überexprimiert.

c-Rel und p100/p52:

Neben den drei Jun-Mitgliedern aus der AP-1 Familie von Transkriptionsfaktoren wurden auch zwei Mitglieder aus der NF- κ B Familie identifiziert. Hierbei handelt es sich um das c-Rel Protoonkogen und um NF- κ B2 (p100/p52) in Bande 5a. In beiden Fällen scheint es sich hier um Abbauprodukte der Proteine zu handeln, da sich die isolierten Banden bei 34 kDa befinden. Auf die Rolle des Transkriptionsfaktors p52, hinsichtlich seines Einflusses auf die AP-1 Aktivität und die Expression von AP-1 Faktoren, wird in **Kapitel 4.4** genauer eingegangen. Eine physikalische Interaktion von c-Jun konnte jedoch weder mit p52 noch mit c-Rel im Koimmunpräzipitationsexperiment nachgewiesen werden.

Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus der Reinigung und der Massenspektrometrie im Westernblot ist in **Abbildung 16** dargestellt. Die Daten sind dabei in verschiedene Gruppen unterteilt denen die Mitglieder der jeweiligen Transkriptionsfaktorfamilien zugeordnet sind.

Das Ausschneiden der Banden für die Massenspektrometrie aus dem SDS-Gel hat zur Folge, dass nur ein Teil der am synthetischen *JUN* Promotor gebundenen Faktoren tatsächlich mittels MS analysiert wird, und zwar nur diejenigen, die ein sichtbares Signal im gefärbten Coomassie Gel zeigen. Es ist demnach wahrscheinlich, dass Informationen für diese Proteine verlorengehen, deren Konzentration unter der Nachweisgrenze für die Coomassie-Färbung liegen und die deshalb nicht aus dem Gel isoliert wurden. Aus diesem Grund wurden zusätzliche Mitglieder der NF- κ B-, ATF/CREB- und AP-1/Fos-Familie, sowie zusätzliche IRF-Transkriptionsfaktoren im Westernblot analysiert.

Die Analyse des JunPro78-Sepharose-Pools zeigt deutlich, dass der **NF- κ B** Faktor p52 in den Hodgkinzellen besonders stark angereichert wurde. Der mittels MS ebenfalls identifizierte Faktor c-Rel zeigt hingegen nur eine sehr schwache Bande. Aus diesem Grund wurde auf weitere Analysen hinsichtlich der Rolle von c-Rel im Zusammenhang mit der ungewöhnlichen AP-1 Aktivität in den Hodgkinzellen verzichtet. Die beiden Faktoren p50 und p65 wurden bei der Reinigung nicht mit angereichert. RelB hingegen wurde zwar,

möglicherweise aus den oben genannten Gründen, nicht in der MS nachgewiesen, jedoch konnte hier gezeigt werden, dass dieser Faktor, wenn auch nur schwach, an den *JUN* Promotor bindet oder mit Promotor-assoziierten Faktoren interagiert.

In der Gruppe der **ATF/CREB**-Faktoren konnten die Daten aus der Massenspektrometrie für ATF-1 und ATF-3 bestätigt werden. Zusätzlich wurde auch die Anreicherung von ATF-2 überprüft, einem Faktor, der in der Literatur oft als Interaktionspartner von c-Jun beschrieben wird (Hayakawa, *et al.*, 2004; Lopez-Bergami, *et al.*, 2010; Hinz und Scheidereit, 2014). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass auch ATF-2 eine Komponente der angereicherten Fraktion ist. Das Vorhandensein von weiteren Faktoren dieser Familie in dieser Fraktion, welche am synthetischen *JUN* Promotor angereichert wurde, wie beispielsweise ATF-7, B-ATF und CREB1 sowie CREB2, konnte nicht gezeigt werden.

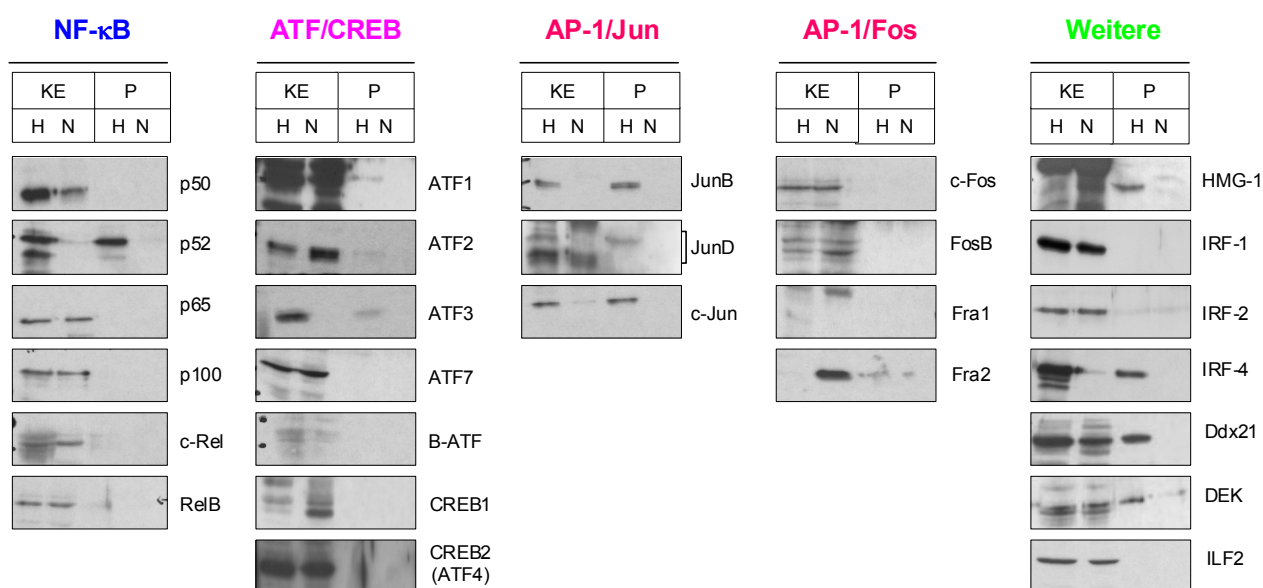


Abbildung 16: Analyse einiger ausgewählter Proteine des gereinigten JunPro78-Sepharose-Pools im Westernblot:

Dargestellt sind die Expressionsdaten ausgewählter Proteine, welche mittels LC-MS/MS identifiziert wurden. In einigen Fällen wurden zusätzliche Proteine einer bestimmten Proteinfamilie mit untersucht. H = L428; N = Namalwa; KE = Kernextrakt; P = gereinigter JunPro78-Sepharose-Pool.

Eine Bestätigung der massenspektroskopischen Daten durch Westernblot-Analysen erfolgte ebenfalls für alle drei Mitglieder der **AP-1/Jun** Familie (c-Jun, JunB und JunD). Proteine der **AP-1/Fos** Familie wurden nicht durch Massenspektrometrie identifiziert und konnten auch mittels Westernblot nicht als Bestandteil der gereinigten Fraktion identifiziert werden. Obgleich eine stimulusabhängige Interaktion von c-Jun und c-Fos an AP-1-DNA-Bindemotiven häufig beobachtet wird (Chiu, *et al.*, 1988; Wu, *et al.*, 1992), spielt sie bei der permanenten Expression von c-Jun in Hodgkinzellen offenbar keine Rolle, da kein c-Fos im JunPro78-Sepharose-Pool nachgewiesen wurde.

In der letzten Spalte in **Abbildung 16** sind verschiedene weitere durch die Massenspektrometrie identifizierte Proteine dargestellt. Die Anreicherung von DEK, Ddx21 und IRF-4 konnte im Westernblot bestätigt werden. Zusätzlich, auf Basis der IRF-4 Daten, wurden auch die Faktoren IRF-1 und IRF-2 überprüft, für die jedoch keine Anreicherung in dem am JunPro78 gebundenen Komplex nachgewiesen wurde. Bei dem Nachweis von ILF-2 stellte sich heraus, dass dieser Faktor entweder nicht in der Fraktion angereichert wurde, oder dass seine Menge unterhalb der Nachweisgrenze im Westernblot liegt. Ebenfalls getestet wurde das **High Mobility Group Box Protein HMG-1** welche bereits zuvor in einer identischen Testreinigung, ausgehend von 20 mg Gesamtprotein, angereichert und identifiziert wurde. Eine Eigenschaft dieses Proteins ist seine sequenzunspezifische DNA Bindung. Die unspezifische Bindung von HMG-1 an den *JUN* Promotor in den Hodgkinzellen konnte auch in diesem Versuch bestätigt werden. Hinsichtlich der Expression von HMG-1 zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Hodgkinzellen und den Referenzzellen

Für die weitere biochemische Analyse der gereinigten Aktivität am synthetischen *JUN* Promotor wurden verschiedene Oligonukleotide, abgeleitet von JunPro78-WT, in ihren AP-1 Bindestellen, modifiziert (veränderte Basen sind in **Abbildung 17-A** rot dargestellt). In dem Oligonukleotid JunPro78- Δ Jun1 wurde die AP-1 Bindestelle Jun1 von 5'-TGACATCA-3' nach 5'-TGATGTCA-3' modifiziert, in JunPro78- Δ Jun2 wurde Jun2 entsprechend von 5'-TTACCTCA-3' nach 5'-TGAGGTAA-3' umgewandelt und für JunPro78- Δ Jun1+2 sowohl Jun1 und Jun2 in beschriebener Weise verändert.

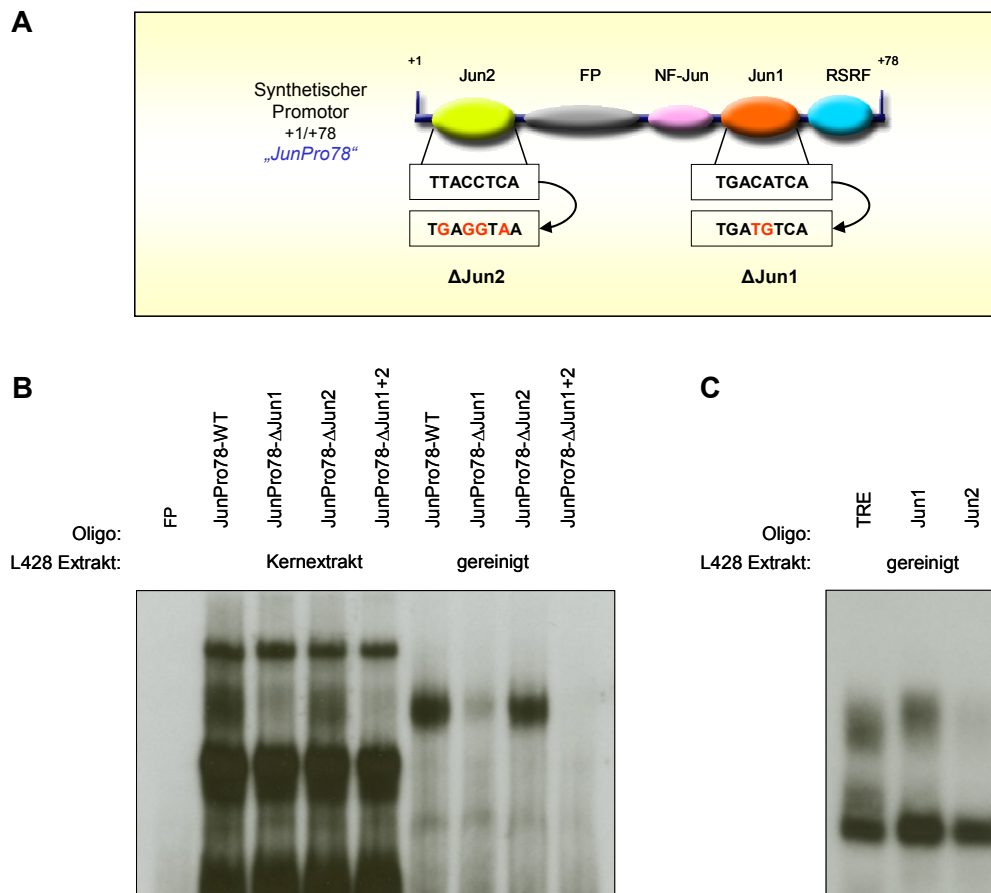


Abbildung 17: Analyse der Bindspezifität des gereinigten JunPro78-Sephrose-Pools im EMSA:

A: Schematische Darstellung der von JunPro78 abgeleiteten Oligonukleotide für den EMSA. **B:** Modifizierte *JUN* Promotor Fragmente zeigen im EMSA, dass die Hodgkin-spezifische Bindeaktivität fast ausschließlich an die Jun1 Sequenz im *JUN* Promotor bindet. Nur eine geringe Restaktivität ist auf die Bindung an die Jun2 Sequenz zurückzuführen. **C:** Durch den Einsatz der kurzen Oligonukleotide für Jun1 und Jun2 konnte das Ergebnis mit den modifizierten *JUN* Promotor Sequenzen bestätigt werden. Es ist auffallend, dass die Intensität der Bindeaktivität an Jun1 vergleichbar mit der an der TRE Sequenz (AP-1 Konsensus Sequenz) ist.

Diese DNA-Fragmente wurden mit dem Klenow-Fragment radioaktiv markiert und für die Analyse im EMSA verwendet. Mit Hilfe dieser modifizierten synthetischen *JUN* Promotoren konnte gezeigt werden, dass die gereinigte Aktivität mit hoher Spezifität an die Jun1-Sequenz des Promotors bindet (**Abbildung 17-B**). Durch Verwendung von JunPro78- Δ Jun1 konnte eine nahezu vollständige Auslöschung der Hodgkin-spezifischen Aktivität erreicht werden. Die geringe Restaktivität ist auf die Bindung an die Jun2 Sequenz zurückzuführen. Die Mutation der Jun2 Sequenz hingegen verringert die Signalstärke nur wenig, was durch die Verwendung von JunPro78- Δ Jun2 gezeigt wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass die gereinigte Aktivität kaum an Jun2 bindet. Mit dem Oligonukleotid JunPro78- Δ Jun1+2 wurde gezeigt, dass die gereinigten Proteine ausschließlich an die Jun1 Sequenz binden. Diese Bindung wurde zusätzlich durch die Verwendung von kurzen spezifischen Oligonukleotiden für die Jun1 und Jun2 Bindestelle bestätigt (**Abbildung 17-C**). Vergleicht man die Bindungsaktivitäten von Jun1 und TRE, so zeigt sich, dass die gereinigte Aktivität nahezu vollständig auch an die TRE-Sequenz bindet. Die Zusammensetzung der gereinigten Fraktion wurde genauer in Supershift-Ansätzen im EMSA analysiert (**Abbildung 18**).

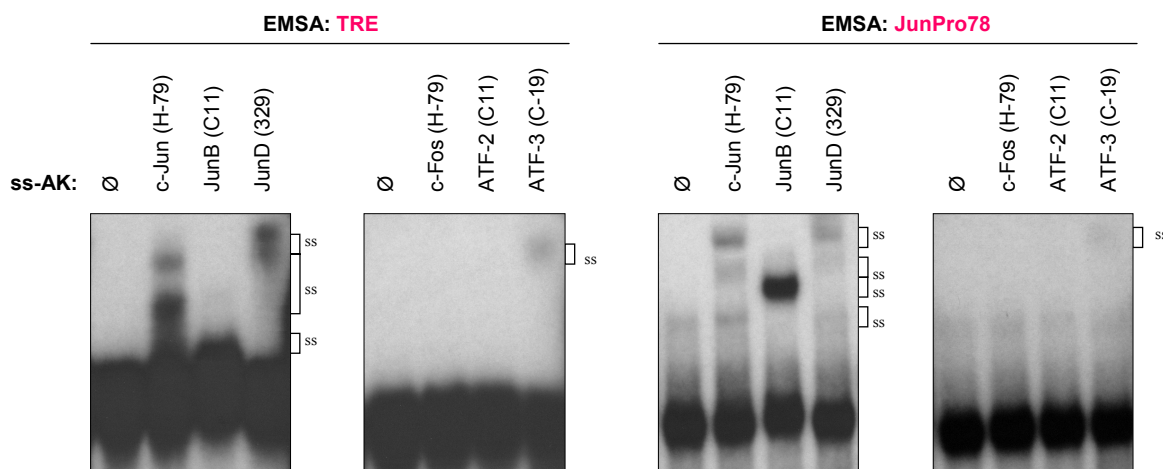


Abbildung 18: Analyse der Zusammensetzung des am synthetischen *JUN* Promotor „JunPro78“ gereinigten Fraktion:

Mit Supershift Antikörpern lässt sich die Zusammensetzung der gereinigten Fraktion genauer untersuchen. Auf dem TRE Konsensus Motiv (*links*) konnte die Bindung aller drei Jun Mitglieder der AP-1 Familie, sowie die Bindung von ATF-3 nachgewiesen werden. JunB zeigt auf diesem Oligonukleotid nur ein geringes Supershift-Verhalten aus dem Komplex heraus. Auf der „JunPro78“ Sequenz (*rechts*) konnten ebenfalls die drei Jun Mitglieder der AP-1 Familie, sowie die Bindung von ATF-3 nachgewiesen werden. Hier hingegen ist ein klarer Supershift für JunB zu beobachten.

Es konnte in diesem Experiment bestätigt werden, dass die gereinigte Fraktion die Transkriptionsfaktoren c-Jun, JunB, JunD und ATF-3 enthält. Diese Beteiligung von ATF-3 an der AP-1 Aktivität in den Hodgkinzellen sowie seine Bindung an den *JUN* Promotor ist ein weiterer signifikanter Befund dieser

Analyse. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Faktoren sowohl an den synthetischen *JUN* Promotor als auch an die TRE Konsensussequenz binden. Interessant ist hier das unterschiedliche Verhalten von JunB auf den beiden DNA-Fragmenten. Während der Supershift auf der TRE Konsensussequenz nur durch eine marginale Verlagerung des AP-1 Komplexes dargestellt wird, sieht man auf dem synthetischen Promotor eine klare Supershiftbande für JunB. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass der JunB-Heterodimerkomplex auf der TRE-Sequenz eine andere Zusammensetzung hat als auf dem synthetischen Promotor.

Die Transkriptionsfaktoren c-Fos und ATF-2 sind neben JunB und JunD die am häufigsten beschriebenen Interaktionspartner von c-Jun. Das Heterodimer c-Jun/ATF-2 wird beispielsweise bei der Regulation der Expression von ATF-3 beschrieben (Liang, *et al.*, 1996), während das c-Jun/c-Fos Heterodimer meist stimulusabhängig induziert wird (Wu, *et al.*, 1992). Aufgrund der möglichen Interaktionen mit c-Jun und dem Befund, dass ATF-2 und ATF-3 im Westernblot in der gereinigten Fraktion nachweisbar sind, wurden diese beiden Faktoren ebenfalls im EMSA-Supershift unter Verwendung der gereinigten Fraktion untersucht. Eine Interaktion von ATF-2 mit c-Jun konnte jedoch weder auf der TRE-Sequenz noch auf dem synthetischen *JUN* Promotor nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Menge an ATF-2 im JunPro78-Sepharose-Pool zu gering. Ebenfalls untersucht wurde die Interaktion von p52 und c-Rel auf dem synthetischen *JUN* Promotor mittels EMSA-Supershift. Obwohl p52 und c-Rel zu den durch LC-MS/MS-Analyse im JunPro78-Sepharose-Pool nachgewiesenen Proteinen gehören (vgl. **Tabelle 1**), konnte für beide Proteine auf diesem Oligonukleotid keine Supershiftbande im EMSA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Ursache dafür könnte eine Absättigung des DNA Fragmentes mit Faktoren höherer Affinität sein, welche die Bindung eines niedrigaffinen Transkriptionsfaktors (p52 oder c-Rel) verhindert.

4.3 Identifizierung von ATF-3 als deregulierte AP-1 Aktivität in Zellen des Hodgkin Lymphoms

Aufgrund der Daten aus der Reinigung einer Hodgkin-spezifischen DNA-Bindeaktivität am *JUN* Promotor (**Kapitel 4.2**), in denen ATF-3 als gebundenes Protein identifiziert wurde, sollte die Rolle dieses Transkriptionsfaktors im Hodgkin Lymphom genauer untersucht werden. Betrachtet man die Expression von ATF-3 in den Hodgkinzelllinien (**Abbildung 19-A**), so fällt auf, dass ATF-3 nicht nur stark überexprimiert wird, sondern auch ausschließlich im Kern lokalisiert ist. Dieser Befund wird auch durch die Daten aus der Immunfluoreszenz (**Abbildung 20**) bestätigt.

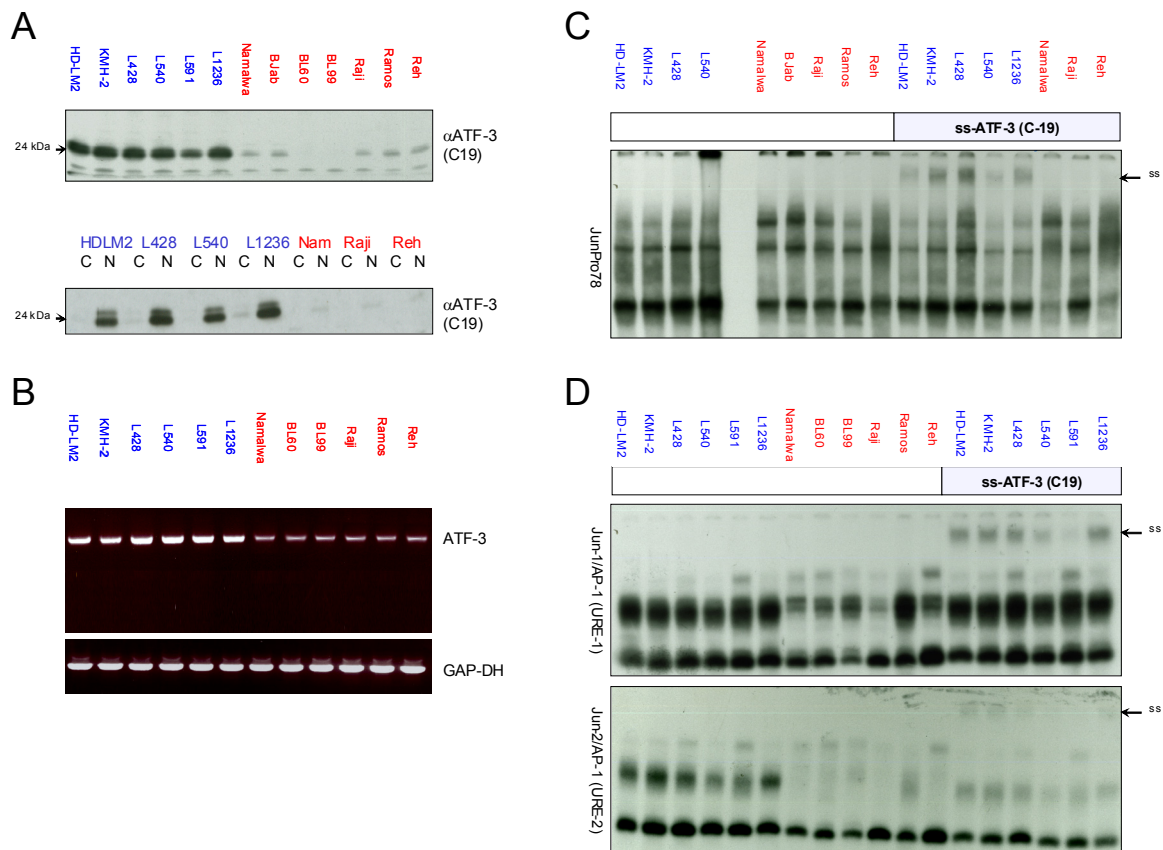


Abbildung 19: ATF-3 wird in Zellen des Hodgkin Lymphoms überexprimiert:

A: Zellen des Hodgkin Lymphoms weisen im Vergleich zu den Referenzzelllinien eine Überexpression von ATF-3 auf (oben). Westernblot-Analysen von Kern-/Zytoplasmafraktionen zeigten, dass ATF-3 ausschließlich im Kern lokalisiert ist (unten). **B:** Durch RT-PCR mit Primern gegen die 3'-UTR und die 5'-UTR und anschließende Auftrennung in einem 0,8%-igen Agarosegel konnten Δ ZIP-Varianten als positive Regulatoren der c-Jun Expression ausgeschlossen werden. **C:** Die Supershift Analyse von ATF-3 aus Gesamtzelllysaten im EMSA zeigt deutlich eine Bindung dieses Proteins an den synthetischen *JUN* Promotor „JunPro78“ in den Hodgkinzellen. **D:** Die Bindung von ATF-3 erfolgt sowohl an die Jun1- als auch an die Jun2 Sequenz des *JUN* Promotors.

Hier sieht man deutlich die Kernlokalisierung von ATF-3 in der Hodgkinzelllinie L428 (ATF-3(C-19)/FITC), während die Referenzzelllinie Namalwa keine Färbung aufweist. Die DAPI-Färbung wurde für die Darstellung der Kerne verwendet, um in der Überlagerung beider Abbildungen die Kernlokalisierung besser sichtbar zu machen.

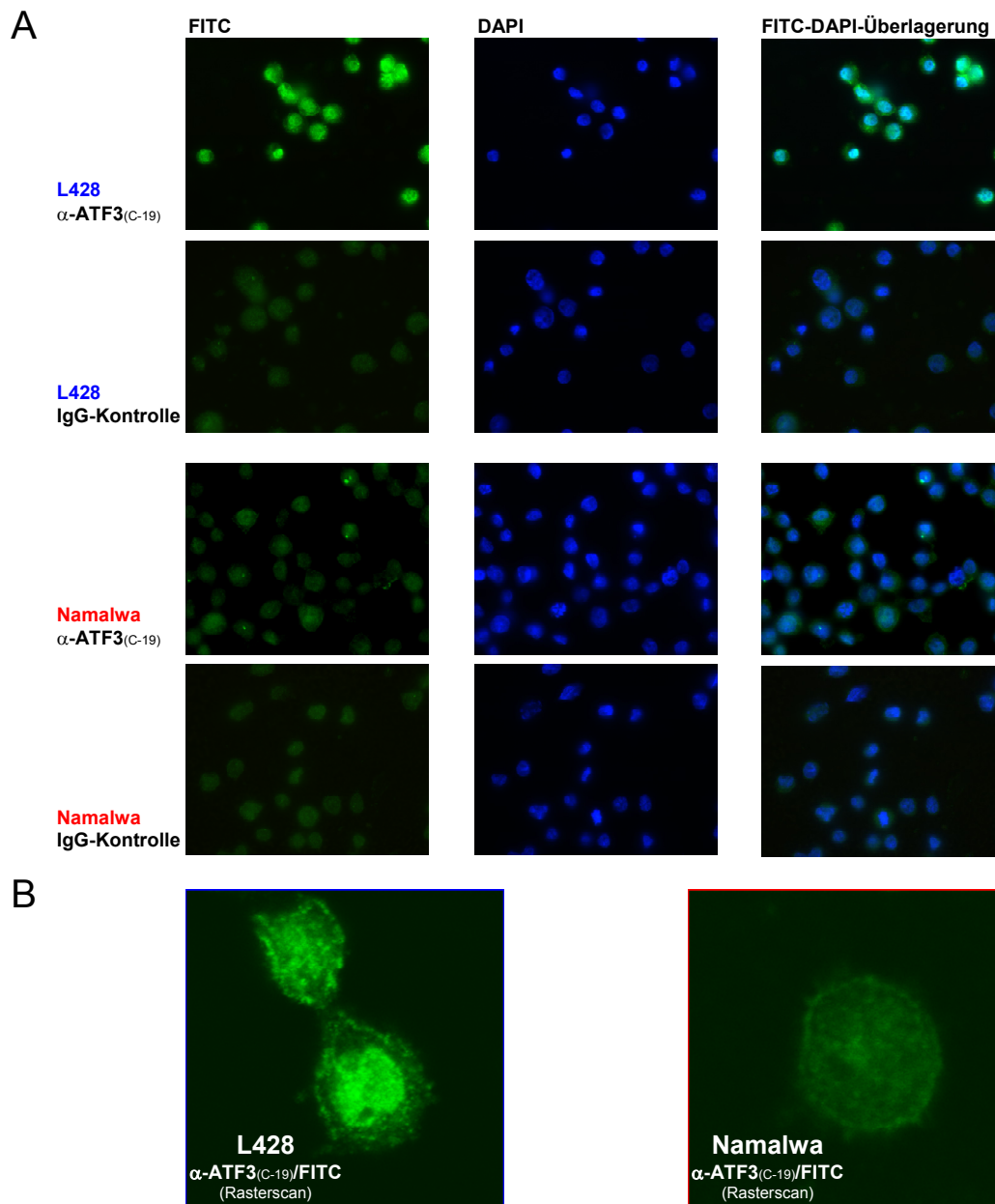


Abbildung 20: ATF-3 ist in Zellen des Hodgkin Lymphoms ausschließlich im Kern lokalisiert:

A: Immunfluoreszenzaufnahmen von L428 und Namalwa und **B:** Vergrößerung einzelner Zellen durch Rasterscan.

ATF-3 ist ein Mitglied der ATF/CREB Familie von Transkriptionsfaktoren. Chen *et al.* und Liang *et al.* zeigten, dass anders als sein Name „Activating Transcription Factor 3“ angibt, ATF-3 eher eine reprimierende als eine aktivierende Wirkung auf die Transkription hat (Chen, *et al.*, 1994; Liang, *et al.*, 1996). Es wird vermutet, dass ATF-3 inhibitorische Kofaktoren am Promotor stabilisiert. Natürlich vorkommende alternativ gespleißte Isoformen von ATF-3 sind verschiedene ATF-3- Δ Zip Varianten (Chen, *et al.*, 1994; Hashimoto, *et al.*, 2002). Diesen Isoformen fehlt die Leucin-Zipper-Domäne und damit die

Fähigkeit zur Bindung an das ATF/CRE Motiv. Im Gegensatz zu ATF-3 können die ATF-3-ΔZip Varianten die Transkription stimulieren, weil sie inhibitorische Faktoren binden und vom Promotor fernhalten.

Für den Nachweis von natürlich vorkommenden alternativ gespleißten Isoformen von ATF-3 wurde die Gesamt-RNA verschiedener Hodgkinzelllinien sowie von verschiedenen Referenzzelllinien isoliert. Mit Oligo(dT)15 Primer und M-MuLV Reverse Transkriptase erfolgte laut **Kapitel 3.2.15** in Material und Methoden die Herstellung der cDNA. Spezifische Primer, welche gegen die 3'UTR und die 5'UTR gerichtet waren, wurden im nächsten Schritt in einer PCR mit der cDNA als Matrize verwendet. Durch den Einsatz dieser speziellen Primer wird gewährleistet, dass jede Isoform einer gesuchten mRNA eines bestimmten Gens, welche in cDNA übersetzt wurde, in der PCR amplifiziert wird. In **Abbildung 19-B** sieht man deutlich, dass auch die mRNA für ATF-3 in Hodgkinzellen, im Vergleich zu den Vergleichszellen, erhöht ist. Alternativ gespleißte Isoformen, wie etwa für ATF-3-ΔZip, konnten in Hodgkinzellen nicht nachgewiesen werden, und werden damit als mögliches aktivierendes Element für die unnatürliche Überexpression von c-Jun ausgeschlossen. Die Größe von *ATF3* liegt bei 546 bp während sie für *ATF3-ΔZip* durch das Einfügen eines zusätzlichen 145 bp Exons bei 688 bp liegen müsste.

Neben der hier gezeigten Überexpression von ATF-3 in Hodgkinzellen (vergleiche **Abbildung 19-A**, **Abbildung 19-B**), und seiner ausschließlichen Lokalisierung im Kern (vergleiche **Abbildung 19-A**, **Abbildung 20-A**), sollte nun überprüft werden, ob ATF-3 am *JUN* Promotor bindet. Hodgkinzelllysate wurden einer Supershiftanalyse mit dem ATF-3-Antikörper (C-19) und dem synthetischen *JUN* Promotor „JunPro78“ (**Abbildung 19-C**), sowie den jeweiligen AP-1 Bindemotiven des *JUN* Promotors, der Jun1- und der Jun2-Sequenz (**Abbildung 19-D**), unterzogen. Das Ergebnis zeigt, dass ATF-3 an den *JUN* Promotor bindet und für alle untersuchten Hodgkinzellen einen Supershift zeigt, welcher auf dem synthetischen *JUN* Promotor für die Referenzzelllinien fehlt (**Abbildung 19-C**). Man erkennt weiterhin, dass ATF-3 Teil der zuvor angereicherten Hodgkin spezifischen AP-1 Bindeaktivität (**Kapitel 4.2**) ist, da das für Hodgkinzellen spezifische EMSA Signal in den Supershift Ansätzen reduziert ist. Betrachtet man die Ergebnisse für die Bindemotive Jun1 und Jun2, so zeigt sich, dass ATF-3 in verstärktem Maße an die Jun1 Sequenz bindet, wobei hier auch die Gesamt-AP-1 Bindeaktivität weitaus höher ist, als auf der Jun2 Sequenz. Schwächere ATF-3 Supershifts beobachtet man auf der Jun2 Sequenz. Hier jedoch kommt es zu einer sehr starken Reduktion des AP-1 Signals, welche man auf der Jun1 Sequenz nicht beobachtet. Dieses unterschiedliche Verhalten von ATF-3 auf den beiden Sequenzen kann ein Hinweis dafür sein, dass ATF-3 zwar an beide Sequenzen bindet, jedoch auf der Jun1 Sequenz mit anderen AP-1 Faktoren konkurriert. Dies würde eine Erklärung für das nahezu unveränderte AP-1 Signal in den Supershift Ansätzen auf dieser Sequenz sein. Auf der ATF-ähnlichen Jun2 Sequenz hingegen scheint ATF-3 einer der Hauptfaktoren zu sein, welche hier das AP-1 Signal ausmachen.

Nachdem gezeigt wurde, dass ATF-3 in Hodgkinzellen nicht nur überexprimiert wird, sondern auch direkt mit dem *JUN* Promotor interagiert, stellte sich die Frage, ob in diesen Zellen auch eine direkte Interaktion zwischen ATF-3 und c-Jun stattfindet, wie sie bereits stimulusabhängig in anderen Zellen

beschrieben wurde (Hai und Curran, 1991). Um eine solche Interaktion nachzuweisen, wurde eine Ko-Immunpräzipitation in Zelllysaten der Hodgkinzelllinien HDLM-2 und L428, sowie in Lysaten von den Referenzzelllinien Namalwa und REH durchgeführt.

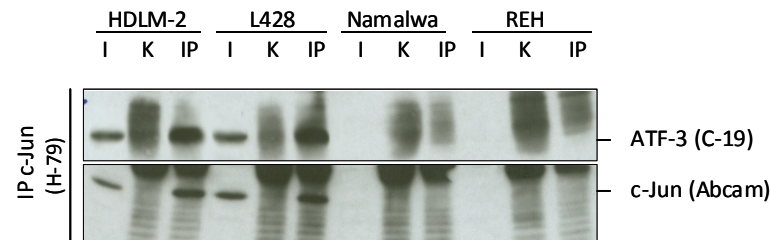


Abbildung 21: Physikalische Wechselwirkung zwischen c-Jun und ATF-3 in Lysaten von Hodgkinzellen:

Sowohl c-Jun als auch ATF-3 sind in Hodgkinzellen überexprimiert und zeigen durch eine Ko-Immunpräzipitation aus Gesamtzelllysaten eine physikalische Interaktion miteinander im Westernblot. (I = Input, K = Isotypkontrolle (Rabbit Kontroll IgG), IP = Immunpräzipitation c-Jun (H-79 Rabbit)).

Wie **Abbildung 21** dargestellt, konnte eine physikalische Wechselwirkung von c-Jun mit ATF-3 in den Hodgkinzellen im Westernblot nachgewiesen werden. In den Referenzzellen wird keines der beiden Proteine in nachweisbarer Menge gebildet, weder ATF-3 noch c-Jun sind durch die Anreicherung mittels Immunpräzipitation nachweisbar.

Welche Funktion kommt ATF-3 im Zusammenhang mit der ungewöhnlichen AP-1 Aktivität in Hodgkinzellen zu? Diese Frage kann nur beantwortet werden, wenn ATF-3 aus dem Gesamtsystem eliminiert wird. Ein möglicher Ansatz ist hier die Herunterregulation von ATF-3 mit geeigneter siRNA in den Hodgkinzellen. Das Design der siRNAs erfolgte, wie im **Kapitel 3.2.18** beschrieben, mit dem siRNA Designer von Dharmacon. Die in den Vektor pmU6 klonierten siRNAs wurden zuerst transient in HeLa Zellen getestet, welche für vier Stunden mit PMA stimuliert wurden, um eine induzierte Expression von ATF-3 zu bewirken (Daten nicht gezeigt). Die siRNA, welche eine gute Herunterregulation von ATF-3 bewirkte (si-ATF-3-#1), sowie eine Kontroll-siRNA (scrambled siRNA, si-Ctrl), wurden nun jeweils zusammen mit pEGFP-N1 in die Hodgkinzelllinie L428 transfiziert. Die Kotransfektion von siRNA und einem Vektor, welcher das Grüne Fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, ist notwendig, da die Transfektionseffizienz mittels Elektroporation in den Hodgkinzellen meist unter 40% liegt und die Zellen 90 Stunden nach der Transfektion mittels FACS nach GFP-positiven Zellen sortiert werden sollten um daraus Gesamtzelllysate zu präparieren. Die Lysate wurden auf ein 12%-iges SDS-Gel geladen, die Herunterregulation von ATF-3, sowie deren Effekt auf andere AP-1 Faktoren im Westernblot analysiert. Das Ergebnis der Herunterregulation von ATF-3 ist in **Abbildung 22** dargestellt.

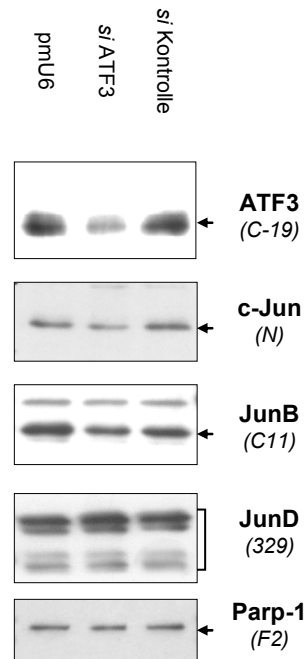


Abbildung 22: Die Herunterregulation von ATF-3 mittels siRNA und ihre Auswirkung auf die AP-1 Expression:

Die Zelllinie L428 wurde transient mit der siRNA gegen ATF-3 (si-ATF-3-#1) in dem Vektor pmU6 und mit pEGFP-N1 kotransfiziert. Als Kontrolle diente eine verifizierte Kontroll-siRNA im Vektor pmU6 (scrambled siRNA, si-Ctrl). Die Expression von c-Jun, JunB und JunD wurde vier Tage nach der Transfektion in den GFP-positiv sortierten Zellen im Westernblot analysiert. Parp-1 dient hier als Ladekontrolle.

Die Expression von ATF-3 in L428 konnte durch die Vektor-basierte siRNA deutlich herunterreguliert, jedoch nicht komplett eliminiert werden. Die Analyse der Faktoren der Jun/AP-1 Familie ergab, dass sowohl c-Jun, als auch JunB eine verminderte Expression in den Zellen aufweisen, bei denen ATF-3 herunterreguliert wird. Ein Effekt auf die Expression von JunD wurde nicht beobachtet.

ATF-3 wird in Hodgkinzellen nicht nur verstärkt exprimiert, sondern konnte auch als ein weiterer Faktor der konstitutiven AP-1 Aktivität in diesen Zellen identifiziert werden, der an der Regulation der Expression von c-Jun beteiligt ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass ATF-3 ausschließlich im Kern lokalisiert ist (**Abbildung 19-A** und **Abbildung 20**). Seine Bindung erfolgt im EMSA sowohl an die Jun1- als auch die Jun2-Sequenz im *JUN* Promotor (**Abbildung 19-C** und **D**). Weiterhin konnte eine physikalische Interaktion von ATF-3 mit c-Jun in Hodgkinzellen gezeigt werden (**Abbildung 21**). Die Herunterregulation von ATF-3 mittels siRNA resultierte in einer verminderten Expression von c-Jun in der Hodgkinzelllinie L428 (**Abbildung 22**).

4.4 Konstitutiv aktives NF- κ B bewirkt eine erhöhte AP-1 Aktivität

Eine der Kernfragen dieser Arbeit betrifft die Auswirkungen der konstitutiven NF- κ B Aktivität in den Hodgkinzellen auf die AP-1 Aktivität. Eine Vielzahl von Prozessen, die zur Aktivierung von NF- κ B führen, bewirken auch eine Aktivierung der MAP-Kinase Signalwege und damit eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie. Beispiele dafür sind die Aktivierung der TNF-Rezeptor Superfamilie durch TNF α , CD40-Ligand, BAFF, LTA und LTB, wie auch die Aktivierung von Interleukin-Rezeptoren durch Interleukine. Aber welche der Faktoren, die die Hodgkinzelle selbst in verstärktem Maße herstellt, führen tatsächlich zu einer autokrinen Antwort in der Zelle?

4.4.1 Die Wirkung exokriner Faktoren der Hodgkinzellen auf andere Zellen

Eine Vielzahl der NF- κ B Zielgene kodieren Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren, die in ihrer Wirkung auf die Zelle zum Teil wieder eine Aktivierung von NF- κ B und/oder AP-1 zur Folge haben. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem die in der folgenden Tabelle 2 aufgeführten exokrinen Faktoren.

Tabelle 2: Einige exokrine Faktoren, deren Expression in Abhängigkeit von NF- κ B erfolgt:

Exokriner Faktor:	Literaturreferenzen:
TNF α	(Collart, <i>et al.</i> , 1990; Shakhov, <i>et al.</i> , 1990)
Lymphotoxin α (LTA)	(Worm, <i>et al.</i> , 1998)
Lymphotoxin β (LTB)	(Kuprash, <i>et al.</i> , 1996)
Interferon γ (IFN- γ)	(Sica, <i>et al.</i> , 1992; Sica, <i>et al.</i> , 1997)
MIP-1 α und MIP-1 β	(Grove und Plumb, 1993; Widmer, <i>et al.</i> , 1993)
IL-1 α	(Kortmann, <i>et al.</i> , 1984; Mori und Prager, 1996)
IL-1 β	(Kortmann, <i>et al.</i> , 1984; Hiscott, <i>et al.</i> , 1993)
IL-2	(Hoyos, <i>et al.</i> , 1989; Serfling, <i>et al.</i> , 1989; Lai, <i>et al.</i> , 1995)
IL-6	(Liebermann und Baltimore, 1990; Shimizu, <i>et al.</i> , 1990; Son, <i>et al.</i> , 2008)
IL-8	(Kunsch, <i>et al.</i> , 1994; Kang, <i>et al.</i> , 2007)
IL-10	(Xu und Shu, 2002)
IL-11	(Bitko, <i>et al.</i> , 1997)
IL-13	(Hinz, <i>et al.</i> , 2002)
IL-15	(Azimi, <i>et al.</i> , 1998)
IL-17	(Shen, <i>et al.</i> , 2006)
GM-CSF	(Schreck und Baeuerle, 1990; Bunting, <i>et al.</i> , 2007)
G-CSF	(Nishizawa und Nagata, 1990)
RANTES (CCL5)	(Moriuchi, <i>et al.</i> , 1997)

Die Expression einiger dieser Faktoren wird nicht ausschließlich durch NF- κ B, sondern auch durch AP-1 reguliert. Hierzu zählt zum Beispiel RANTES (CCL5).

Um zu überprüfen, ob die Hodgkinzelllinien Zytokine sekretieren, die NF- κ B und AP-1 in anderen Zelllinien aktivieren können, wurde frisch isolierter Kulturüberstand einer 48 Stunden Kultur verschiedener Hodgkinzelllinien für verschiedene Zeitpunkte auf HEK-293 Zellen und HeLa Zellen gegeben. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten mit dem Kulturüberstand wurden die Zellen mit PBS (4°C) gewaschen und mit Baeuerle-Puffer lysiert. Jeweils 3 μ g des Lysates wurde im EMSA entweder mit der TRE-Konsensussequenz für die AP-1 Aktivität oder mit dem H2K-Oligonukleotid für die NF- κ B Aktivität getestet. Die Ergebnisse der Wirkung der Hodgkinkulturüberstände auf HEK-293 Zellen ist in **Abbildung 23** exemplarisch für die beiden Hodgkinzelllinien HDLM-2 und KMH-2 in einem Zeitverlauf bis zu 24 Stunden dargestellt. Man erkennt deutlich einen Anstieg der NF- κ B Aktivität der nach 0,5 Stunden (HDLM-2) bzw. 2,5 Stunden (KMH-2) beginnt und bei 24 Stunden sein Maximum findet. Ähnlich verhält es sich mit der AP-1-Aktivität. Hier beginnt der Anstieg nach einer Stunde und findet sein Maximum bei 8 Stunden. Weiterhin interessant ist hier, dass bei 0,5 Stunden die basale AP-1-Aktivität zuerst reduziert wird und bei einer Stunde wieder auf den Wert der basalen Aktivität zurückkehrt. Dieser Effekt wird mit allen Hodgkin-Überständen in HEK-293 Zellen beobachtet. Möglicherweise kommt es hier zu einer Veränderung in der Zusammensetzung des zum Zeitpunkt Null existierenden AP-1 Komplexes. Eine Untersuchung der Stimulation mit Hodgkinkulturüberständen über 24 Stunden hinaus zeigte eine Abnahme der Signalstärke aufgrund instabiler Faktoren im Kulturüberstand.

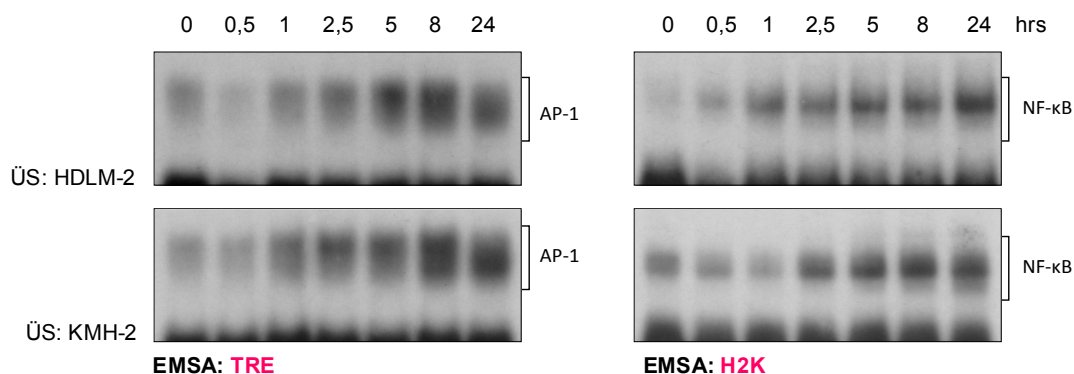


Abbildung 23: Wirkung von Kulturüberständen verschiedener Hodgkinzelllinien auf HEK-293 Zellen:

Exemplarisch ist hier der Effekt auf die AP-1- (TRE) und NF- κ B- (H2K) Bindeaktivität im EMSA für die Überstände der zwei Hodgkinzelllinien HDLM-2 und KMH-2 in einem Zeitverlauf dargestellt. Die Kulturüberstände der Hodgkinzellen stimulieren sowohl die NF- κ B als auch die AP-1 Aktivität in HEK-293 Zellen.

Das Verhalten von HeLa Zellen, die mit Hodgkinkulturüberständen inkubiert wurden, ist hinsichtlich der NF- κ B Aktivität im EMSA mit dem Ergebnis der HEK-293 Zellen vergleichbar. Da diese Zelllinie trotz der Verwendung von serumfreiem Medium eine basal erhöhte AP-1-Aktivität aufwies, wurden für weitere Experimente ausschließlich HEK-293 Zellen verwendet.

Welche Faktoren, die von den Hodgkinzelllinien produziert und sezerniert werden, sind aber nun verantwortlich für die Aktivierung von AP-1 und/oder NF- κ B? Um diese Frage beantworten zu können, wurden die Kulturüberstände verschiedener Hodgkinzelllinien und von zwei Referenzzelllinien mit Membranen einer Zytokin-Matrix („RayBio® Human Inflammation Antibody Array 3“) der Firma

RayBiotech Inc. inkubiert. Hierbei handelt es sich um Membranen, auf welchen an definierten Positionen verschiedene Antikörper gebunden sind, die jeweils spezifisch für ein bestimmtes Zytokin sind. An diese Antikörper binden in einem ersten Schritt spezifisch die jeweiligen Zytokine aus den Kulturüberständen. In einem weiteren Schritt erfolgt wiederum die Inkubation mit einer Mixtur von jeweils Zytokin-spezifischen Antikörpern, die im Anschluß eine Detektion mittels Chemilumineszenz erlauben. Einige ausgewählte Ergebnisse der Analyse der Hodgkinüberstände mit dem RayBio® Human Inflammation Antibody Array 3 sind in **Tabelle 3** zusammengefasst.

Tabelle 3: Analyse von Kulturüberständen von Hodgkin- (blau) und Referenzzelllinien (rot):

Dargestellt ist die Signalintensität für die Detektion der aufgeführten Zytokine im RayBio® Human Inflammation Antibody Array 3. +++ = sehr starke Sekretion, ++ = starke Sekretion, + = normale Sekretion, +/- = schwache Sekretion aber eindeutig über dem Hintergrund des Mediums, - = keine Sekretion.

Name	HDLM-2	KMH-2	L428	L 591	L1236	Namalwa	Reh
IL-6	+++	++	+++	+++	+	-	-
IL-6sR	+++	++	++	+++	+	+	+
IL-8	++	++	++	+++	+/-	+/-	+/-
IL-13	+++	-	+++	+	+	-	-
TNF β (LTA)	+++	++	++	+	+/-	-	-
TGF- β 1	+/-	+	+	+	+/-	-	-
IP-10 (CXCL10)	+	++	+	++	-	-	-
GM-CSF	+	+	+++	+	++	-	-
RANTES (CCL5)	++	+++	+++	+++	++	-	-
MIP-1 α (CCL3)	+	-	-	++	-	++	-
TNF α	-	-	-	-	-	-	-

Daten, die für das jeweilige Zytokin keine Expression in den ausgewählten Zelllinien zeigten, oder keine relevanten Unterschiede zwischen den Hodgkinzellen und den Referenzzellen aufwiesen, sind in dieser Tabelle, bis auf zwei Ausnahmen (MIP-1 α und TNF α), nicht dargestellt. Die quantitative Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm „ImageQuant-TL“ (NonLinear Dynamics Ltd.), wurde in der **Tabelle 3** jedoch, der Übersichtlichkeit halber, semiquantitativ durch „+“ und „-“ dargestellt.

Das Zytokin **Interleukin-6** (IL-6) zeigt eines der stärksten Signale, welches auf die Kulturüberstände der Hodgkinzelllinien beschränkt ist. Es ist ein potenter Induktor der akuten Phase Reaktion und spielt eine wesentliche Rolle bei der endgültigen Differenzierung von B-Zellen und beim Zellwachstum. Dieses Protein wird in erster Linie an Orten von akuter und chronischer Entzündung produziert, wo es in das Serum abgesondert wird. Dort induziert es eine Entzündungsreaktion über den Interleukin-6-Rezeptor. IL-6 ist unter anderem assoziiert mit Krebserkrankungen und entzündlichen Erkrankungen wie der „systemischen juvenilen rheumatoiden Arthritis“. Die Transkription von IL-6 wird durch NF- κ B und AP-1 reguliert (Libermann und Baltimore, 1990; Shimizu, *et al.*, 1990; Chandrasekar, *et al.*, 1999; Son, *et al.*, 2008; Tang,

et al., 2010). Des Weiteren ist Interleukin-6 auch wieder ein potenter Aktivator der AP-1 Aktivität (Melamed, *et al.*, 1993).

Der **Interleukin-6-Rezeptor** ist ein Komplex aus Interleukin-6-Rezeptor α (IL6R, IL-6R α) und dem Interleukin-6-Signaltransducer (IL6ST, IL-6R β , gp130). IL-6R α bindet IL-6 mit geringer Affinität, vermittelt aber nicht die Weiterleitung des Signals. Für eine Signalweiterleitung und die Erhöhung der Affinität von IL-6R α zu IL-6 wird die Assoziation mit der zweiten Komponente des Komplexes, dem IL-6ST, benötigt. **IL-6sR** ist eine lösliche Form des IL-6-Rezeptors (Hibi, *et al.*, 1990; Yamaguchi, *et al.*, 2008). Interessant ist hier, dass das Muster der Signalintensitäten mit dem von IL-6 vergleichbar ist. IL-6sR ist in geringen Mengen auch im Kulturüberstand der Vergleichszelllinien nachweisbar. Die Promotor/Enhancer-Region des IL6R-Gens besitzt Transkriptionsfaktor-Bindestellen für NF- κ B und AP-1.

Interleukin-8 (IL-8) gehört zur Familie der CXC-Chemokine und ist einer der wichtigsten Mediatoren für Entzündungsreaktionen. Dieses Chemokin wird von verschiedenen Zelltypen sezerniert und fungiert unter anderem als Chemoattraktant für neutrophile Granulozyten, basophile Granulozyten und T-Zellen, aber nicht für Monozyten. Die Mengen an sekretiertem IL-8 liegen für die Hodgkinzellen deutlich höher als für die Vergleichszelllinien. Die Transkription von IL-8 wird unter anderem durch NF- κ B und AP-1 reguliert (Kunsch und Rosen, 1993; Mukaida, *et al.*, 1994; Roebuck, 1999; Chang, *et al.*, 2002; Kang, *et al.*, 2007).

Das anti-inflammatorische Zytokin **Interleukin-13** (IL-13) spielt in verschiedenen Stadien der B-Zell-Reifung und B-Zell-Differenzierung involviert. Es reguliert die Aktivität von Makrophagen herunter und hemmt dadurch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Die Expression von IL-13 wird durch NF- κ B reguliert (Hinz, *et al.*, 2002). Eine Sezernierung von IL-13 erfolgt bei den Hodgkinzelllinien sehr heterogen und zwar sehr stark durch die Zelllinien HDLM-2 und L428, nur schwach durch L591 und L1236 und überhaupt nicht durch die Hodgkinlinie KMH-2. Bei den Vergleichszelllinien wurde ebenfalls kein IL-13 im Kulturüberstand nachgewiesen.

Lymphotoxin- α (TNF- β , LTA) ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Superfamilie. Diese Zytokin wird durch Lymphozyten produziert und sezerniert und bildet Heterotrimere mit Lymphotoxin- β . LTA vermittelt eine Vielzahl inflammatorischer, immunstimulierender und antiviraler Antworten, ist bei der Entwicklung der sekundären lymphatischen Organe beteiligt und spielt eine Rolle bei der Apoptose. Die Sekretion von Lymphotoxin- α in den Kulturüberstand ist nur auf die Hodgkinzellen beschränkt. Bei der Zelllinie L1236 zeigt sich eine verhältnismäßig geringe Sezernierung in den Kulturüberstand, die nur geringfügig über dem Hintergrund der Vergleichszellen liegt. Die Expression von Lymphotoxin- α wird durch NF- κ B reguliert (Messer, *et al.*, 1990; Paul, *et al.*, 1990), vermag aber wiederum auch die NF- κ B Aktivität, insbesondere die Prozessierung von p100 zu p52, zu induzieren (Messer, *et al.*, 1990; Mordmüller, *et al.*, 2003).

Durch eine Vorinkubation von L428 mit einem speziellen neutralisierenden Antikörper gegen LTA, sollte gezeigt werden, ob Lymphotoxin- α einen maßgeblichen Anteil an der Aktivierung von AP-1 und NF- κ B in HEK-293 durch die Hodgkinkulturüberstände hat. Die L428-Zellen wurden dazu in frischem Medium mit dem neutralisierenden Antikörper gegen TNF- β (Anti-TNF- β (α -TNF- β), clone 9B9, Millipore) beziehungsweise IgG1-Isotyp Kontrollantikörper 24 Stunden vorinkubiert (2 μ g/ml Suspension). Anschließend wurde der Kulturüberstand dieser Zellen, mit dem enthaltenen Antikörper, für verschiedene

Zeitpunkte mit HEK-293 Zellen inkubiert und die Gesamtzelllysate dieser Zellen im EMSA auf NF- κ B und AP-1 Aktivität getestet.

Diese Neutralisierung von Lymphotoxin- α im Kulturüberstand der Hodgkinzelllinie L428 zeigte in HEK-293 Zellen interessanterweise keine Aktivierung von NF- κ B mehr, sowie eine stark abgeschwächte Aktivierung von AP-1 nach Stimulation mit diesem Kulturüberstand (**Abbildung 24**).

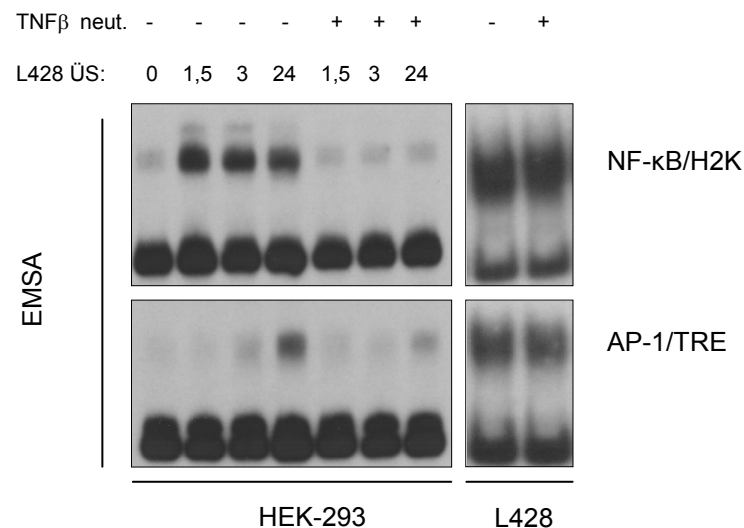


Abbildung 24: Neutralisierung von TNF- β im Überstand von L428 und der Effekt auf die induzierbare NF- κ B und AP-1 Aktivität in HEK-293 durch Hodgkin-Kulturüberstände:

Eine L428 Suspension wurde für 24 Stunden mit einem TNF- β neutralisierenden Antikörper (α -TNF- β) beziehungsweise Isotypkontrolle vorinkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand für die Stimulation von HEK-293 verwendet. Man erkennt eine deutliche Inhibition der NF- κ B und AP-1 Aktivität von HEK-293 Zellen im EMSA. Dieses Verhalten der Aktivitäten ist in den L428 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit α -TNF- β nicht zu beobachten.

Im Vergleich zu dem Effekt in den HEK-293 war das Ergebnis mit dem neutralisierenden Antikörper auf die permanente Aktivierung von NF- κ B und AP-1 in L428 Zellen marginal bis vernachlässigbar. TNF- β scheint damit eine entscheidende Rolle bei der induzierbaren NF- κ B- und AP-1-Aktivität in HEK-293 zu spielen.

Der Wachstumsfaktor **TGF- β 1** (Transforming Growth Factor- β 1) ist ein multifunktionales Protein, welches die Proliferation, Beweglichkeit, Differenzierung, Zellteilung, Zelltod und andere Funktionen und Prozesse in den Zellen kontrolliert. Es wird von vielen unterschiedlichen Zellen synthetisiert und besitzt spezifische Rezeptoren, über die es viele andere Wachstumsfaktoren sowohl positiv, als auch negativ reguliert. TGF- β 1 bindet den TGF- β Typ II Rezeptor (TGF- β RII) und dieser wiederum transphosphoryliert und aktiviert den Typ-I-Rezeptor (TGF- β RI). Der aktivierte TGF- β RI phosphoryliert nun unter anderem die SMAD Proteine Smad2 und Smad3, die daraufhin in den Zellkern translozieren, wo sie Komplexe mit anderen DNA-bindenden Faktoren und Ko-Aktivatoren, beziehungsweise Ko-Repressoren, bilden. Eine Störung des TGF- β /SMAD Signalweges wird in Zusammenhang mit einer Vielzahl verschiedener Krebsarten gebracht. Erhöhte Konzentrationen von TGF- β 1 werden oft in fortgeschrittenen Karzinomen beobachtet, und korrelieren mit einer erhöhten Tumordinvasivität und einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf. TGF- β 1 ist

unter anderem auch ein potenter Aktivator der NF- κ B Aktivität (Lu, *et al.*, 2004). Eine erhöhte Expression von TGF- β 1 wird beispielsweise durch das hier ebenfalls durch Hodgkinzellen sezernierte Interleukin-13 induziert (Fichtner-Feigl, *et al.*, 2006). Allgemein ist die Menge an sezerniertem TGF- β 1 verhältnismäßig gering, liegt jedoch deutlich über dem Basalwert des Mediums und der Vergleichszellen.

Das Chemokin IFN- γ -inducible protein **10 (IP-10, CXCL10, Eotaxin)** wird als Antwort auf die Stimulation mit IFN- γ von verschiedenen Zelltypen, wie zum Beispiel Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert (Luster, *et al.*, 1985). IP-10 spielt beispielsweise eine Rolle bei der Chemotaxis der Monozyten, T-Zellen, **NK-Zellen** (Natürliche Killerzellen) und der dendritischen Zellen, es fördert die Adhäsion von T-Zellen an Endothelzellen, und es wird ihm auch eine Antitumoraktivität zugeschrieben (Angiolillo, *et al.*, 1995; Dufour, *et al.*, 2002). IP-10 bindet an der Zelloberfläche den Chemokinrezeptor CXCR3. Die Expression von IP-10 wird unter anderem durch NF- κ B und AP-1 reguliert (Hein, *et al.*, 1997). Die Sezernierung von IP-10 von den Hodgkinzellen ist etwas heterogen. L1236 zeigt keine Sekretion von IP-10 in das Kulturmedium. KMH-2 und L591 zeigen dagegen recht starke Signale, während die von HDLM-2 und L428 etwas geringer ausfallen. Interessant ist unter anderem auch, dass IFN- γ weder von den Hodgkinzellen noch von den Vergleichszellen in das Kulturmedium sezerniert wird. In Bezug auf IFN- γ konnten keine Signale auf der Membran des RayBio® Human Inflammation Antibody Array 3 detektiert werden, die stärker waren als der Hintergrundwert des Mediums selbst (Daten nicht gezeigt).

Das Zytokin **GM-CSF (CSF2)** stimuliert das Wachstum, die Produktion und die Differenzierung von blutbildenden Vorläuferzellen verschiedener Linien, wie zum Beispiel Granulozyten, Makrophagen, eosinophile Granulozyten und Erythrozyten. Die aktive Form dieses Proteins agiert extrazellulär als Homodimer. Dieses Zytokin ist Zielgen von NF- κ B (Schreck und Baeuerle, 1990; Bunting, *et al.*, 2007) und vermag, abhängig vom Zelltyp, auch AP-1 zu stimulieren (Adunyah, *et al.*, 1991). Die beiden Zelllinien L428 und L1236 sekretieren dieses Zytokin in sehr großen Mengen, während die anderen Hodgkinzelllinien eher moderate Mengen in das Kulturmedium abgeben. In den Referenzzelllinien konnte keine Produktion von GM-CSF nachgewiesen werden.

Das Chemokin **RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted)** beziehungsweise **CCL5 (C-C Motiv Ligand 5)** ist ein 8 kDa Protein, welches eine entscheidende Rolle bei der Chemotaxis von T-Zellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, sowie eine aktive Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe spielt. Seine Funktion wird hauptsächlich über den Chemokinrezeptor CCR5 vermittelt, jedoch vermag es auch an die verwandten Rezeptoren CCR1 und CCR3 zu binden (Daugherty, *et al.*, 1996; Proudfoot, *et al.*, 2001; Struyf, *et al.*, 2001). Die Expression von RANTES wird unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 ko-reguliert (Moriuchi, *et al.*, 1997; Krensky und Ahn, 2007). RANTES wurde von allen Hodgkinzelllinien stark bis sehr stark sezerniert, während die Referenzzelllinien keine Produktion von RANTES aufwiesen. Von Tang und Kollegen wird eine CCL5 abhängige c-Jun Expression beschrieben, welche wiederum zu einer erhöhten Expression von Interleukin-6 führt (Tang, *et al.*, 2010). Eine verstärkte Sekretion von Interleukin-6 wurde ebenfalls in Hodgkinzellen nachgewiesen (siehe oben). Sowohl RANTES als auch sein Rezeptor CCR5 werden in Hodgkinzellen konstitutiv exprimiert (Aldinucci, *et al.*, 2008).

MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 α) beziehungsweise **CCL3** (C-C Motiv Ligand 3) ist neben RANTES ein weiteres chemotaktisches Protein der Familie der CC-Zytokine. Es wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert aber auch anderen Zelllinien, wie B- und T-Zellen. MIP-1 α wird ausschließlich von den Hodgkinlinien HDLM-2 und L591, aber auch von der Referenzlinie Namalwa sezerniert. Alle anderen getesteten Zelllinien zeigten keine Sekretion von MIP-1 α . Interessant ist, dass dieses Protein ein häufig zitiertes NF- κ B Zielgen ist (Grove und Plumb, 1993; Widmer, *et al.*, 1993; Hinz, *et al.*, 2002; Krappmann, *et al.*, 2004) und daher anzunehmen ist, dass dieses Protein, auf Grund der konstitutiven NF- κ B Aktivität, von allen Hodgkinlinien produziert werden sollte.

TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor α) ist eines der wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokine, welches über weitere Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), wesentliche lokale und systemische Entzündungsreaktionen steuert. Es wird vornehmlich von B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen sowie aktivierten dendritischen Zellen gebildet und freigesetzt. Es ist involviert in der Regulation der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Apoptose, des Lipidmetabolismus und es wird in Zusammenhang mit verschiedensten Krankheiten, wie Autoimmunerkrankungen, Insulinresistenz und Krebserkrankungen gebracht. TNF α ist nicht nur einer der potentesten NF- κ B Aktivatoren, sondern induziert ebenso die Signalwege zur Aktivierung von AP-1 (Brenner, *et al.*, 1989). Die Aktivierung erfolgt durch Bindung als TNF α -Trimer an den TNF-Rezeptor (TNF-R1 oder TNF-R2). Mit TNF α verhält es sich bei den Daten ähnlich wie mit MIP-1 α . Auch dieses Protein ist als NF- κ B Zielgen bekannt (Hinz, *et al.*, 2002; Krappmann, *et al.*, 2004), kann jedoch in keiner der untersuchten Hodgkinlinien im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die Vergleichslinien sezernieren, wie erwartet, kein TNF α .

4.4.2 Erhöhte AP-1 Aktivierung durch ektopisch exprimiertes p52

Zu den Proteinen, für die eine Anreicherung am *JUN* Promotor gezeigt werden konnte, gehört der Transkriptionsfaktor p52. Es sollte nun geprüft werden, ob p52 für die Expression von Proteinen der AP-1 Familie notwendig ist. Als Modell für diese Untersuchungen wurden HEK-293 Zellen verwendet.

HEK-293 Zellen weisen mehrere interessante Merkmale auf. Einerseits exprimieren sie vergleichsweise normale Mengen an p100, andererseits ist die prozessierte Form von p100, das p52, nicht vorhanden oder es liegt unterhalb der Nachweisgrenze für die Chemilumineszenz im Westernblot (siehe auch Nonaka, *et al.*, 2005 und Coope, *et al.*, 2002). Es fällt weiterhin auf, dass in den HEK-293 Zellen die Transkriptionsfaktoren RelB und JunB, beides Zielgene von NF- κ B, ebenfalls nicht oder nur sehr schwach exprimiert werden. Da die Expression von p65 und p105/p50 in HEK-293 Zellen normal ist, und die Prozessierung von p100 zu p52 entweder eingeschränkt oder komplett ausgeschaltet ist, sollte die Wirkung von p52 auf die Expression von Mitgliedern der AP-1 Familie, aber auch auf die Expression von NF- κ B Zielgenen, mit dieser Zelllinie als Modellorganismus näher beleuchtet werden.

Zu diesem Zweck wurden HEK-293 Zellen mit Vektoren für NIK oder IKK α transient transfiziert um zu zeigen, dass die Prozessierung von p100 zu p52 im Allgemeinen in den HEK-293 Zellen funktioniert. Exprimiert man transient jeweils eines dieser beiden Proteine, so ist beschrieben, dass es zu einer verstärkten Prozessierung von p100 zu p52 kommt (Senftleben, *et al.*, 2001; Coope, *et al.*, 2002; Müller und Siebenlist,

2003). Dieser Effekt wird durch die Kotransfektion beider Faktoren noch verstärkt. Sowohl die ektopische Expression von NIK als auch von IKK α in den hier verwendeten HEK-293 Zellen führte nach 48 Stunden zu einer Prozessierung von p100 zu p52 (Daten nicht gezeigt). Im Fall von exogen exprimiertem NIK war die Prozessierung von p100 stärker als für exogen exprimiertes IKK α . Die Menge an produziertem p52 war in diesen transformierten HEK-293 Zellen jedoch verglichen mit HeLa und anderen Vergleichszellen eher gering. Das Ergebnis dieses Vorversuches zeigte jedoch, dass die Prozessierung von p100 im Allgemeinen in HEK-293 Zellen funktioniert.

Für die Untersuchung der Wirkung von p52 auf die Expression von Mitgliedern der AP-1 Familie, wie auch auf die Expression von NF- κ B Zielgenen, wurden HEK-293 Zellen stabil mit dem linearisierten Vektor pCDNA3-Flag-p52 oder als Kontrolle mit dem Leervektor pCDNA3 (Mock) transfiziert. Die Selektion der Klone erfolgte wie unter **Kapitel 3.1.6** in Material und Methoden beschrieben mit Geneticin (G-418 450 μ g/ml Suspension).

Ein besonders interessantes Resultat aus der Anreicherung einer Hodgkin-spezifischen DNA-Bindungsaktivität im *JUN* Promotor in **Kapitel 4.2** war die Beobachtung, dass der Transkriptionsfaktor p52 am *JUN* Promotor bindet. Um der Frage nun auf den Grund zu gehen, wie sich eine anhaltende Prozessierung von p100 auf die Expression von Mitgliedern der AP-1-Familie und deren DNA-Bindeaktivität auswirken würde, wurden die mit p52 stabil transfizierten HEK-293 Zellen als Simulationsmodell für diese persistente Prozessierung herangezogen. Da die Kulturüberstände der Hodgkinzellen bereits eine effiziente Aktivierung von AP-1 und NF- κ B in HEK-293 zeigten (**Kapitel 4.4.1**), wurden sowohl ein Mock- (HEK-293-M#3) als auch ein p52-Klon (HEK-293-p52#6) dieser Zelllinie für verschiedene Zeitpunkte mit dem Kulturüberstand von KMH-2 stimuliert und anschließend in Baeuerle-Puffer lysiert. Jeweils 5 μ g Lysat wurden im EMSA-Assay verwendet und auf die DNA-Bindeaktivität an der TRE- und H2K-Bindesequenz getestet. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in **Abbildung 25-A** dargestellt. Man erkennt deutlich, dass die basale DNA-Bindeaktivität für AP-1 (TRE) in HEK-293-p52-Zellen bereits zweifach im Vergleich zu HEK-293-Mock-Zellen erhöht ist. Durch die Stimulation mit dem Kulturüberstand der Hodgkinzelllinie beobachtet man bereits zwei Stunden nach der Stimulation einen Anstieg dieser Bindeaktivität in den Mock transfizierten Zellen. Betrachtet man nun die p52 exprimierenden Zellen, so zeigt sich ein enormer Anstieg dieser Bindeaktivität. Das Maximum dieser Aktivität liegt bei etwa zwei Stunden. Danach nimmt die Aktivität langsam ab.

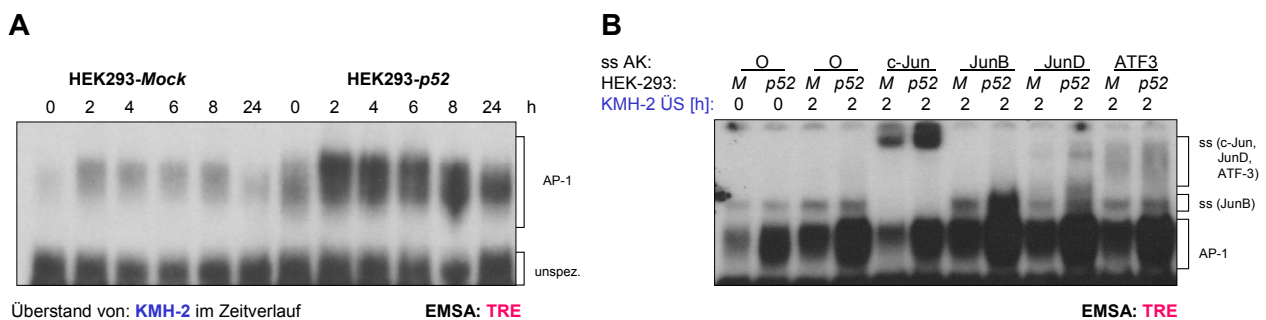
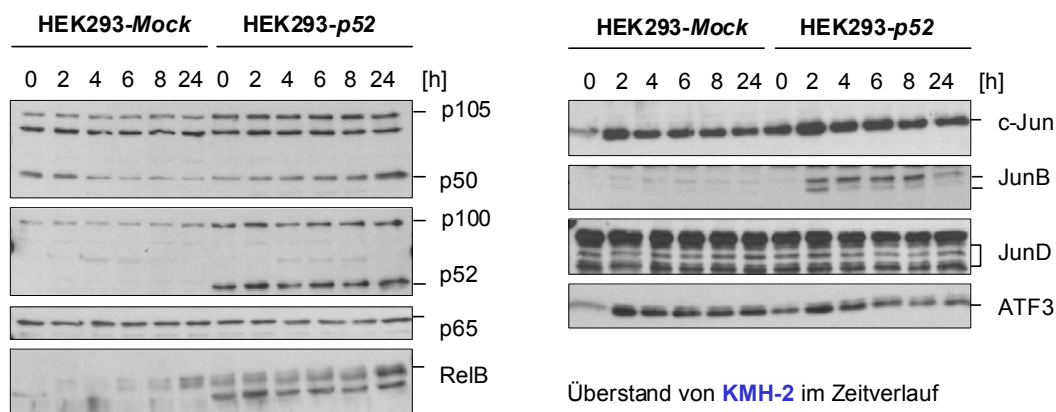


Abbildung 25: Stabile Expression von p52 in HEK-293 Zellen:

A: Die ektope Expression von p52 verstärkt in HEK-293 Zellen den aktivierenden Effekt von KMH-2 Hodgkin Kulturüberstand auf die AP-1 Aktivierung im EMSA. **B:** Analyse der Zusammensetzung des durch Hodgkinüberstände induzierten AP-1-Komplexes. Der durch KMH-2 Hodgkin-Kulturüberstand in HEK-293 Zellen aktivierte AP-1-Komplex enthält c-Jun, JunB, JunD und ATF-3. Dieser induzierbare Effekt wird durch die stabile Expression von p52 in diesen Zellen verstärkt. M = stabiler HEK-293-Mock-Klon, p52 = stabiler HEK-293-p52-Klon. (Antikörper: c-Jun (H-79), JunB (C11), JunD (329) und ATF3 (C-19))

Die Analyse der induzierbaren AP-1-Aktivität ist in **Abbildung 25-B** unter Zuhilfenahme von speziellen Supershift-Antikörpern im EMSA dargestellt. Verwendet wurden hier neben den unstimulierten Kontrollen, Extrakte der Mock- (M) und p52-transfizierten (p52) HEK-293 Zellen, welche für zwei Stunden mit dem Kulturüberstand von KMH-2 stimuliert wurden. Die Extrakte wurden für jeweils 30 Minuten mit den Supershift-Antikörpern (c-Jun, JunB, JunD und ATF-3) vorinkubiert, anschließend mit dem EMSA-Assay gemischt und nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf das native Acrylamidgel geladen. Das Ergebnis im EMSA zeigt eine starke Zunahme der c-Jun und JunB Aktivierung in den p52-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Mock-Zellen. Ebenfalls induziert, jedoch weniger stark, werden die Transkriptionsfaktoren JunD und ATF-3. Interessanterweise setzt sich der durch Hodgkinkulturüberstand induzierte AP-1-Komplex in den HEK-293 abgeleiteten HEK-293-p52-Zellen aus den gleichen Komponenten zusammen, wie sie auch in den Hodgkinzellen in der konstitutiven AP-1-Aktivität zu finden sind. Ob es sich nur um eine Zunahme der Bindeaktivität der jeweiligen AP-1 Faktoren handelt, oder aber auch um eine erhöhte Expression dieser Proteine, sollte im Westernblot gezeigt werden.

**Abbildung 26:** Analyse der Expression von NF-κB und AP-1 Proteinen in HEK-293-p52-Zellen nach Stimulation mit KMH-2 Überständen:

Durch die ektope Expression von p52 wird die basale Expression der NF-κB Mitglieder p105, p100 und RelB und der AP-1/ATF Mitglieder c-Jun und ATF-3 in HEK-293 Zellen erhöht. Durch Stimulation mit KMH-2 Kulturüberstand sieht man zudem eine induzierte Zunahme von RelB, c-Jun, ATF-3 und JunB. Diese Induktion wird in den p52 transfizierten Zellen für RelB, c-Jun und JunB verstärkt. JunB zeigt als einziger Faktor keine erhöhte basale Expression in HEK-293-p52-Zellen zum Zeitpunkt Null.

Die stabile Expression von p52 in HEK-293 Zellen führt dazu, dass die basale Expression (Zeitpunkt Null = unstimuliert) der NF-κB Mitglieder p105, p100 und RelB im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen erhöht ist, während die p65 Expression nicht beeinflusst wird (**Abbildung 26**). Ebenfalls erhöht ist die basale (Zeitpunkt 0 h) Expression von ATF-3 und c-Jun verglichen mit den Mock-transfizierten Zellen. Werden die

Zellen nun für verschiedene Zeiten mit dem Kulturüberstand der Hodgkinzelllinie KMH-2 stimuliert, so zeigt sich eine starke stimulusabhängige Expression für JunB in den p52-transfizierten Zellen, während JunB in den Mock transfizierten Zellen nur geringfügig induziert wird. Interessant ist hier, dass JunB als einziger Faktor keine erhöhte basale Expression in HEK-293-p52-Zellen zum Zeitpunkt Null zeigt. Ebenfalls durch den Kulturüberstand induziert wird die Expression von c-Jun, RelB und ATF-3, wobei ein verstärkender Einfluss von p52 auf die stimulusabhängige Zunahme der Expression nur für c-Jun und RelB, nicht aber für ATF-3, beobachtet werden kann.

Neben der erhöhten basalen Expression von c-Jun in HEK-293-p52-Zellen, und der beobachteten induzierten Expression durch den Hodgkin-Kulturüberstand von KMH-2 Zellen, sollte in einem zusätzlichen Experiment gezeigt werden, dass die Expression von p52 einen direkten Einfluss auf die Transkriptionsaktivität am *JUN* Promotor hat. HEK-293-Mock-Zellen und HEK-293-p52-Zellen wurden dazu mit dem Reporterkonstrukt des *JUN* Promotors, pGL2-Basic-WTK, transfiziert (**Kapitel 3.1.5.3. und 3.3.10**) und 48 Stunden nach der Transfektion mit Hodgkinkulturüberstand von KMH-2 für verschieden Zeitpunkte stimuliert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivitäten aus den Lysaten erfolgte mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers im Mithras LB 940 (Berthold Technologies). Die Auswirkung der stabilen ektopischen Expression von p52 in HEK-293 Zellen auf den *JUN* Promotor ist in **Abbildung 27** dargestellt.

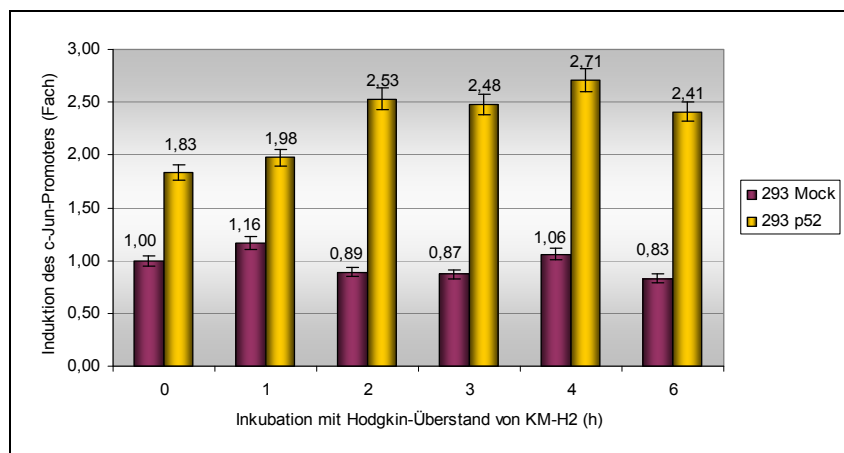


Abbildung 27: Auswirkung der stabilen ektopischen Expression von p52 in HEK-293 Zellen auf die Aktivität des *JUN* Promotors nach Stimulation mit dem Kulturüberstand der Hodgkinzelllinie KMH-2:

Durch die ektopische Expression von p52 ist die basale Transkriptionsaktivität am *JUN* Promotor (WTK siehe **Abbildung 7**) bereits 1,8-fach induziert. Durch die Stimulation mit KMH-2 Kulturüberständen erfolgte eine weitere Zunahme der Transkriptionsaktivität am *JUN* Promotor bis auf das 2,7-fache der basalen Aktivität der Mock-transfizierten Zellen.

Man erkennt deutlich, dass die basale Transkriptionsaktivität am *JUN* Promotor in den unstimulierten mit p52 transfizierten Zellen bereits 1,8-fach induziert ist. Werden die Zellen nun für verschiedene Zeitpunkte mit Kulturüberstand von KMH-2 stimuliert, so zeigt sich eine zeitabhängige stetige Zunahme der Transkriptionsaktivität in HEK-293-p52-Zellen, die ihr Maximum zwischen etwa drei und vier Stunden bei einer bis zu 2,5-fachen Induktion findet und dann konstant bleibt, während in HEK-293-Mock-Zellen nahezu keine Veränderung der Transkriptionsaktivität am *JUN* Promotor zu beobachten ist. Dieses Ergebnis kann

jedoch nicht durch die beobachteten Expressionsdaten (**Abbildung 26**) und die Ergebnisse aus dem EMSA (**Abbildung 25-A**) für die HEK-293-Mock-Zellen erklärt werden, da im „Dual-Luciferase Assay“ ausschließlich die Transkriptionsregulation am verwendeten *JUN* Promotor untersucht wird (vergleiche WTK **Abbildung 7**). Der mögliche Einfluss zusätzlicher regulativer Elemente stromabwärts von diesem DNA-Abschnitt wird damit nicht untersucht.

In einem geeigneten Zellmodell (HEK-293), in welchem die Expression von p100 intakt ist, konnte durch die stabile ektopische Expression von p52 gezeigt werden, dass die basale Expression von RelB, ATF-3 und c-Jun unter der Kontrolle von p52 steht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von RelB, c-Jun und besonders von JunB stimulusabhängig in den p52-transfizierten Zellen induziert wird. Die vorliegenden Daten führten daher zwangsweise zu der Frage, wie sich eine Herunterregulation von p52 in den Hodgkinzellen auf die AP-1 Aktivität auswirken würde. Dieser Frage wird in dem folgenden **Kapitel 4.4.3** nachgegangen.

4.4.3 Auswirkung einer Depletierung von NF- κ B/p52 auf die Expression von AP-1 Faktoren

Durch exogene stabile Expression von p52 in den HEK-293 Zellen konnte gezeigt werden, dass p52 an der Expression von Mitgliedern der AP-1 und ATF Familie von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist. In umgekehrter Weise sollte nun geprüft werden, ob eine Herunterregulation von p52 die Expression von AP-1 Proteinen hemmt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Wege beschritten:

1. *indirekt*, durch die Hemmung der NF- κ B Aktivierung durch Verwendung des Superrepressors I κ B α Δ N (**Kapitel 4.4.3.1**) und
2. *direkt*, durch den Einsatz der siRNA Technologie (**Kapitel 4.4.3.2**).

4.4.3.1 Herunterregulierung von NF- κ B/p52 durch den Superrepressor I κ B α Δ N resultiert in einer verminderten AP-1 Aktivität bei Hodgkinzellen

In Hodgkinzellen wird die konstitutive NF- κ B DNA-Bindeaktivität durch ektopische Expression des Superrepressors I κ B α Δ N stark herunterreguliert (Bargou, *et al.*, 1997). I κ B α Δ N ist eine dominant negative I κ B α -Mutante, die am N-Terminus um 70 Aminosäuren verkürzt ist, wodurch die Serinreste fehlen, die für eine Signal-abhängige Aktivierung und den Abbau notwendig sind. I κ B α Δ N bindet NF- κ B und hält es im Zytoplasma zurück. Das führt in Folge zu einer verminderten Expression von NF- κ B-Zielgenen wie beispielsweise p105/p50, c-Rel, p100/p52 und JunB, aber auch von I κ B α selbst.

Um zu überprüfen, wie sich eine Herunterregulation der NF- κ B Aktivität in Hodgkinzellen, durch die Verwendung des Superrepressors I κ B α Δ N, auf die AP-1 Aktivität in diesen Zellen auswirkt, wurden HDLM-2 Zellen stabil mit diesem Superrepressors transfiziert. Diese Zelllinie wurde dazu mit dem Plasmid pCDNA3-I κ B α Δ N transfiziert und mit dem Antibiotikum Geneticin (G418 100 μ g/ml Suspension) selektioniert. Das Medium wurde dazu mit HEPES auf eine Endkonzentration von 10 mM eingestellt, da das Antibiotikum eine starke Veränderung des pH-Wertes des Mediums verursacht.

Die Analyse von HDLM-2-I κ B α Δ N zeigte eine drastische Herunterregulation der NF- κ B Aktivität, sowie eine Abnahme der AP-1 Aktivität im EMSA (**Abbildung 28-A**). Die obere Abbildung zeigt im Westernblot die Expression von I κ B α Δ N, welche mit einem Antikörper nachgewiesen wurde, der gegen den C-Terminus von I κ B α gerichtet ist (I κ B α C-21) und damit sowohl das endogene I κ B α Protein, als auch das exogene I κ B α Δ N nachweist. Da I κ B α selbst eines der am stärksten durch NF- κ B regulierten Gene ist, beobachtet man durch die Expression von I κ B α Δ N auch eine Herunterregulation des endogenen Proteins. Des Weiteren zeigen diese Klone eine verminderte Expression von p100 im Westernblot (**Abbildung 28-B**). Dass p100 als ein Zielgen von NF- κ B durch die adenovirale Expression von I κ B α Δ N herunterreguliert wird, wurde bereits von Hinz *et al.* durch eine Zielgenanalyse von NF- κ B in Hodgkinzellen gezeigt (Hinz, *et al.*, 2002). Die Expression von p65 hingegen wird durch die ektopische Expression von I κ B α Δ N nicht beeinflusst (**Abbildung 28-B** und Park, *et al.*, 2003). Ferner wird die Expression von JunB, einem NF- κ B Zielgen, stark vermindert (**Abbildung 28-C**).

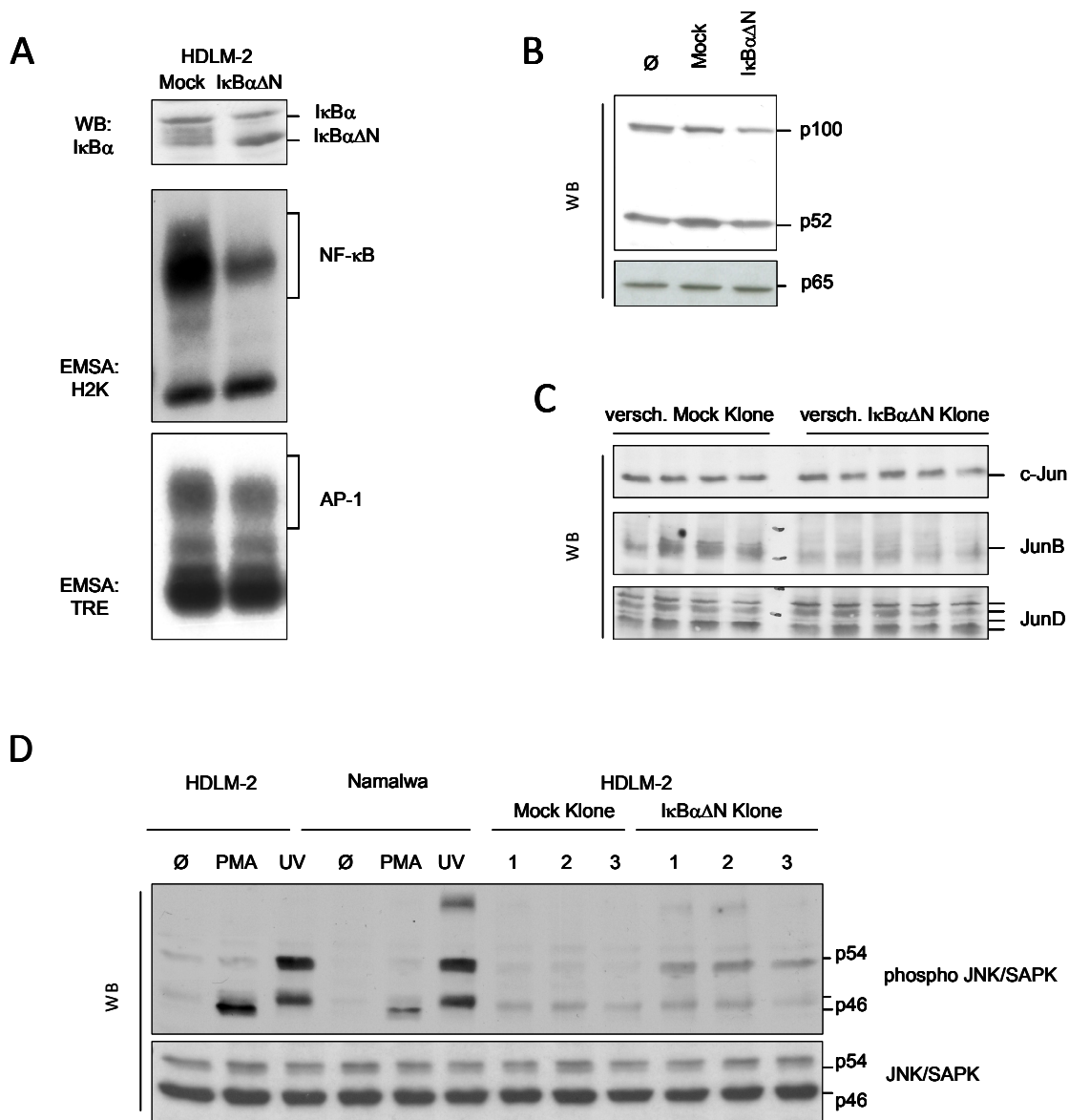


Abbildung 28: Auswirkung der stabilen ektopischen Expression von IκBαΔN in HDLM-2 Zellen:

A: Im EMSA sind durch die Expression von IκBαΔN sowohl die NF-κB- als auch die AP-1-Aktivität reduziert. **B:** p100 ist ein Zielgen von NF-κB, dessen Expression durch die Expression von IκBαΔN reduziert wird. **C:** JunB ist ebenfalls ein NF-κB Zielgen, dessen Expression durch IκBαΔN beeinflusst wird. **D:** Rekonstitution einer persistenten JNK Aktivierung durch die stabile Expression von IκBαΔN in HDLM-2. Die exogene Stimulation mit PMA und UV-Licht führt in Hodgkinzellen (HDLM-2) zu einer Aktivierung von JNK. Eine Inaktivierung von NF-κB durch den Superrepressor IκBαΔN zeigt, dass die JNK Aktivität durch einen NF-κB abhängigen Prozess blockiert wird.

Abbildung 28-C veranschaulicht den Effekt der stabilen Expression von IκBαΔN in der Hodgkinzelllinie HDLM-2 auf die Expression einiger Mitglieder der AP-1 Familie. Die Expression von JunB steht, wie oben schon erwähnt, unter der Kontrolle von NF-κB. Dieser Befund wurde bereits von Krappmann, *et al.*, 2004 durch die stabile Expression von IκBαΔN und anschließende Zielgenanalyse in der Maus Prä-B-Zelllinie 70Z3 gezeigt. Die Expression von c-Jun und JunD wird dagegen durch die ektopische Expression von

I κ B $\alpha\Delta$ N nicht beeinflusst, weshalb zusätzlich der Einfluss von I κ B $\alpha\Delta$ N auf JNK untersucht wurde. Betrachtet man die JNK Aktivität in den Zellen, welche I κ B $\alpha\Delta$ N exprimieren, so fällt auf, dass diese sich nun durch permanent phosphoryliertes JNK darstellen (**Abbildung 28-D**). Dieses Ergebnis zeigt, dass die JNK Aktivität durch einen NF- κ B abhängigen Prozess blockiert wird.

Die Stärken und Schwächen der Verwendung dieses Superrepressors sind leicht zu erkennen. Einerseits ist es möglich eine umfassende Analyse von NF- κ B Zielgenen durchzuführen, da I κ B $\alpha\Delta$ N allgemein zu einer Herunterregulation der NF- κ B-Aktivität und damit auch der Expression von NF- κ B-Mitgliedern, einschließlich p100/p52, führt. Andererseits lässt sich durch die I κ B $\alpha\Delta$ N vermittelte Herunterregulation von p52 nicht schlussfolgern, welchen Anteil p52 bei der Regulation der Expression von NF- κ B Zielgenen hat, da I κ B $\alpha\Delta$ N primär den klassischen NF- κ B Signalweg herunterreguliert. Da p100 ein Zielgen des klassischen Signalweges ist, beeinflusst I κ B $\alpha\Delta$ N sekundär auch den alternativen Signalweg.

4.4.3.2 Herunterregulation von NF- κ B/p52 durch die siRNA-Technologie reduziert die Expression von Mitgliedern der AP-1 Familie in Hodgkinzellen

Es konnte gezeigt werden, dass die Neusynthese des Transkriptionsfaktors JunB einerseits, durch die Expression von I κ B $\alpha\Delta$ N, also die Herunterregulation der NF- κ B Aktivität, negativ beeinflusst wird (**Abbildung 28-C**). Andererseits wird in Folge einer stabilen Expression von p52 in den HEK-293 Zellen eine stimulusabhängige verstärkte Synthese von JunB beobachtet (**Abbildung 26**). Des Weiteren wurde gezeigt, dass in diesen Zellen auch die basale Expression der AP-1 Faktoren c-Jun und ATF-3 und des NF- κ B Faktors RelB erhöht ist. Daher sollte in einem weiteren experimentellen Ansatz versucht werden, mittels siRNAs gegen p52, eine Abhängigkeit der Expression dieser Faktoren von p52 zu zeigen. Die Herunterregulation von einzelnen Transkriptionsfaktoren des NF- κ B Signalweges sollte es zudem möglich machen zwischen dem klassischen und dem alternativen NF- κ B Signalweg zu differenzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben synthetischen siRNAs eine Vielzahl Vektor-basierter shRNA Systeme getestet. Ein Hauptproblem bei der Arbeit mit Hodgkinzellen und vielen anderen lymphatischen Zellen ist die geringe Transfektionseffizienz die bei der Elektroporation erreicht wird. Die Verwendung synthetischer siRNAs mit Fluoreszenzmarkierung bietet einerseits den Vorteil, die transfizierten Zellen anschließend durch FACS anreichern zu können, andererseits haften fluoreszenzmarkierte siRNAs oft unspezifisch an der Zelloberfläche, was zu einer Anreicherung von falsch-positiven Zellen führt. In dieser Arbeit wurden siRNAs ohne Fluoreszenzmarkierung eingesetzt. Die synthetischen siRNAs wurden zunächst in HeLa oder HEK-293 Zellen getestet. Zeigten sie eine effektive Herunterregulierung eines Zielgens, konnte anschließend, unter Verwendung der Sequenzinformation der siRNAs, diese als shRNA in ein geeignetes vektorbasiertes System kloniert werden.

Es wurden shRNA's in den Vektor pmU6 kloniert, mit dem Vektor pEGFP-N1 in Hodgkinzellen kotransfiziert und die Zellen nach zwei bis drei Tagen mittels FACS sortiert. Dieses System ließ jedoch auf Grund fehlender eukaryotischer Selektionsmarker im Vektor keine Etablierung eines stabilen Systems zu, sondern ermöglichte nur die Analyse transienter Effekte. Ein System zur Etablierung stabil exprimierender shRNA's mit der Möglichkeit einer Sortierung der transfizierten Zellen war der Vektor psiRNA-h7SK-

GFP::Zeo der Firma Invivogen. Dieser enthält neben der Klonierungsstelle für die shRNA, welche unter Kontrolle des humanen RNA Polymerase III Promotors 7SK steht, zusätzlich eine Kassette, welche das Grüne Fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert und eine Kassette, welche das Zeozin-Resistenzgen als Selektionsmarker enthält. Mit diesem System war es ebenfalls möglich transiente Effekte nach einer Anreicherung mittels FACS zu beobachten. Auch hier war die Herstellung stabiler shRNA-exprimierender Hodgkinzellklone nicht erfolgreich. Eine mögliche Ursache dafür könnte darin liegen, dass die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren essentiell für das Überleben der Zelle ist. Eine Herunterregulation führt damit entweder zum Zelltod oder zumindest zu schlechteren Überlebensraten, insbesondere unter Stressbedingungen, wie sie im Fall einer Einzelzellselektion auftreten.

Die Verwendung eines mit Tetrazyklin induzierbaren Systems der Firma Invitrogen sollte die Lösung dieses Problems sein. Der Vorteil einer Induzierbarkeit der Expression von shRNA's liegt darin, dass die Wirkung der jeweiligen shRNA bis zu dem Zeitpunkt der Induktion mit Tetrazyklin unterdrückt wird. Damit kann die Selektion der Zellen unbeeinflusst von den Effekten der shRNA erfolgen. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass durch die kontinuierliche Expression der shRNA Langzeitstudien durchgeführt werden können, sofern die Herunterregulation eines bestimmten Zielgens über diesen Zeitraum nicht letal ist. Die Basis dieses Systems sind entweder vorhandene T-REx™ (Tetrazyklin-Repressor exprimierende) Zelllinien oder selbst hergestellte Zelllinien, die den bakteriellen Tetrazyklin-Repressor (Postle, *et al.*, 1984) anhaltend exprimieren. Die Anwendung des Tet-Systems in eukaryotischen Zellen geht auf Arbeiten von Gossen und Bujard, 1992 und Freundlieb, *et al.*, 1999 zurück.

Verschiedene Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen wurden mit dem linearisierten Plasmid pCDNA6-TR transfiziert (**Kapitel 3.1.5.3**). Die Linearisierung für die bessere Integration des Konstruktes in das Genom erfolgte innerhalb der Ampizillin-Resistenzkassette bei Basenpaar 5961 mit dem Restriktionsenzym *FspI*. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Selektion mit Blastizidin in einer Endkonzentration von 4-10 µg/ml Zellsuspension in Abhängigkeit von der jeweiligen Hodgkinzelllinie. Von den sechs verwendeten Hodgkinzelllinien konnten von KMH-2, L428, L591 und L1236 stabile polyklonale T-REx-Linien etabliert werden. Stabile Einzelklone wurden von KMH-2, L1236 und L428 hergestellt. Da die Zelllinie L428 auch für die Anreicherung einer Hodgkin-spezifischen Bindeaktivität am *JUN* Promotor verwendet worden ist (**Kapitel 4.2**), wurde für die weiteren Untersuchungen ein Klon (**Klon 17**) der transformierten Zelllinie **L428-T-REx** verwendet. Die Überprüfung der Klone auf die stabile Expression des Tet-Repressors erfolgte im Westernblot mit einem speziellen Antikörper der Firma MoBiTec gegen das 23 kDa Tet-Repressor Protein (Daten nicht gezeigt).

Das Design der shRNA's erfolgte mit dem BLOCK-iT™ RNAi Designer der Firma Invitrogen (**Kapitel 3.2.18**). Hierzu wurden sowohl Sequenzen von bereits erfolgreich in HeLa-Zellen erprobten synthetischen siRNAs als Grundlage für das Design der Haarnadelstruktur verwendet, als auch weitere durch das Programm produzierte Sequenzen beziehungsweise durch das siDESIGN Center von Dharmacon.

Die Herstellung der Tetrazyklin-Repressor exprimierenden stabilen Hodgkinlinien, sowie der stabilen induzierbaren shRNA Klone wurde in Zusammenarbeit mit Kivia Aparecida Pontes de Oliveira durchgeführt. Das Ziel ihrer Arbeit ist eine umfassende Zielgenanalyse von NF-κB mit der Differenzierung

in Zielgene des klassischen und des alternativen Signalweges in Hodgkinzellen. Gleichfalls wurde von ihr eine neue Methode zur transienten Transfektion von Hodgkinzellen mit synthetischer ACCEL-siRNAs im Labor etabliert und durchgeführt. Die Zielsequenzen dieser synthetischen siRNAs basierten auf den verwendeten shRNAs und sind daher nicht gesondert aufgeführt (siehe **Kapitel 3.2.18**)

Der Klon 17 der Zelllinie L428-T-REx wurde mit dem linearisierten und verifizierten Vektor pENTR™/H1/TO, welcher eine shRNA gegen p52 enthält, transfiziert. Unter Selektion mit Zeocin erfolgte die Auswahl und Vereinzelung stabiler Klone von L428-T-REx mit der entsprechenden shRNA gegen p52. In der **Abbildung 29-A** sind exemplarisch einige positive Klone dieser Zelllinie mit der shRNA p52_2 dargestellt. Die Analyse der Herunterregulation von p100/p52 erfolgte vier Tage nach der Induktion mit Tetrazyklin (1 µg/ml Zellsuspension) im Westernblot. Ein kompletter Mediumwechsel mit frischer Gabe von Tetrazyklin ist wegen der geringen Stabilität von Tetrazyklin in wässriger Lösung an jedem zweiten Tag essentiell.

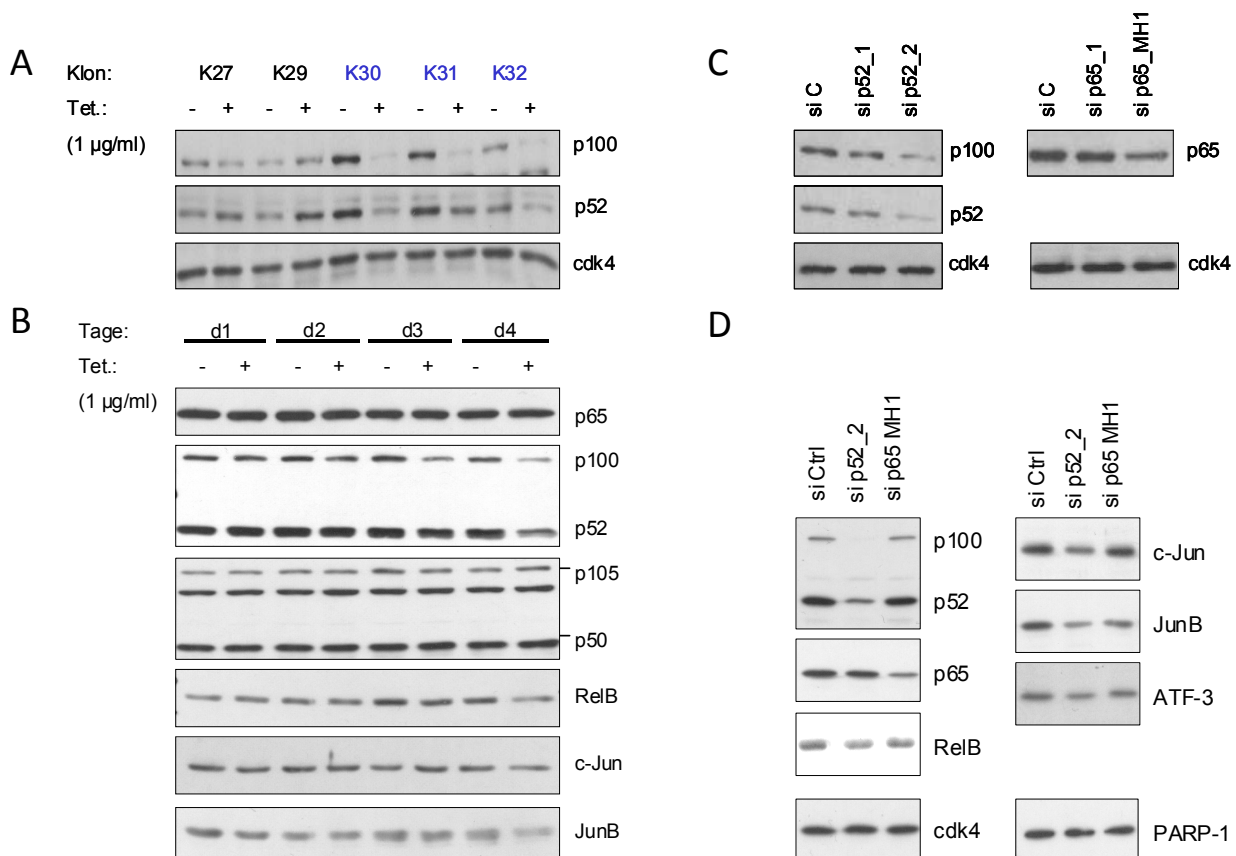


Abbildung 29: Auswirkung der Herunterregulation von p52 mittels shRNA in L428-T-REx Zellen:

A: L428-T-REx (Klon 17) wurde stabil mit der shRNA p52_2 transfiziert. Dargestellt ist eine Auswahl verschiedener Klone (positiv selektionierte in blau). **B:** L428-T-REx (Klon 17) mit shRNA p52_2 (Klon 42) in einem Zeitverlauf mit Tetrazyklin-Induktion über 4 Tage. Analysiert wurde die Expression verschiedener NF-κB und AP-1 Proteine in Abhängigkeit auf die Herunterregulation von p52. **C:** HeLa Zellen wurden transient mit shRNA gegen p52 und p65 transfiziert um eine Vorauswahl einer effizienten shRNA zur Herstellung stabiler Hodgkin-Klone zu treffen. **D:** Synthetische siRNAs gegen p52 und p65 wurden transient in L428 transfiziert und der Effekt ihrer Herunterregulation auf NF-κB und AP-1 Proteine nach vier Tagen im Westernblot analysiert. Dieses Experiment diente als zusätzliche Bestätigung der Beobachtungen in Teilabbildung B. Der Nachweis der Proteine PARP-1 und CDK4 wurde

jeweils als Ladekontrolle verwendet. Teilabbildung D wurde freundlicherweise von Kivia Aparecida Pontes de Oliveira zur Verfügung gestellt.

Die Untersuchung des Effektes der Herunterregulation von p52 auf die Expression verschiedener NF- κ B und AP-1 Mitglieder erfolgte mit dem Klon 42 der Zelllinie L428-T-REx-K17 und ist in einem Zeitverlauf bis zu vier Tagen nach Induktion mit Tetrazyklin in **Abbildung 29-B** dargestellt. Man erkennt deutlich, dass die p100 Expression bereits am Tag drei durch die shRNA beeinflusst wird. Einen Effekt auf p52 beobachtet man jedoch erst am vierten Tag nach der Induktion mit Tetrazyklin. Eine Beeinflussung der Expression von p65 und p105/p50 kann bis zu diesem Zeitpunkt (Tag 4) nicht beobachtet werden. Die Expression von RelB hingegen scheint bereits am Tag drei leicht herunterreguliert zu werden. Dieser Effekt verstärkt sich noch am vierten Tag. Auch bei den beiden Transkriptionsfaktoren c-Jun und JunB zeigt sich am vierten Tag eine Herunterregulation der Expression beider Proteine. Dieser Effekt ist relativ schwach bei der Expression von c-Jun zu beobachten, während sich die Herunterregulation von p52 auf das NF- κ B Zielgen JunB weitaus stärker auswirkt. Die Verifizierung der Ergebnisse erfolgte durch transiente Transfektion verschiedener shRNAs in HeLa Zellen und ist für je zwei unterschiedliche shRNAs gegen p65 und p52 in **Abbildung 29-C** dargestellt. Diese Daten werden zusätzlich gestützt durch die Verwendung der oben erwähnten neuartigen synthetischen siRNAs, mit denen sehr hohe Transfektionseffizienzen in den Hodgkinzellen erzielt werden können (siehe **Abbildung 29-D**). Auch mit diesem transienten System beobachtet man vier Tage nach der Transfektion eine Herunterregulation der RelB Expression als Antwort auf die siRNA vermittelte Herunterregulation von p52. Die Expression von RelB wird jedoch nicht durch Verwendung einer siRNA gegen p65 (si p65 MH1) beeinträchtigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung der siRNA gegen p52 die Expression von c-Jun und JunB stark beeinträchtigt wird, wobei die JunB Expression auch durch die siRNA gegen p65 vermindert wird. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression von ATF-3 durch die Herunterregulation von p52 verringert ist. Dieser Effekt konnte in dem Tetrazyklin induzierbaren System mit der shRNA gegen p52 nicht gezeigt werden, da hier die ATF-3 Expression verglichen mit normalen L428 Zellen deutlich verringert war (möglicher klonaler Effekt bei L428-T-REx (Klon 17) mit shRNA p52_2 (Klon 42)). Durch die Verwendung der siRNA Technologie in den Hodgkin-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression der AP-1 Proteine c-Jun, JunB und ATF-3 unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors p52 reguliert wird.

5 Diskussion

Das IKK/NF- κ B System spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Tumorentitäten. Die konstitutive Aktivierung von NF- κ B wurde beispielsweise nachgewiesen bei primären Tumoren und Tumorzelllinien des Brustkrebses (Nakshatri, *et al.*, 1997; Ahmed, *et al.*, 2006; Yoneda, *et al.*, 2013), des Lungenkarzinoms (Tichelaar, *et al.*, 2004; Stathopoulos, *et al.*, 2008), des Kolonkarzinoms (Lind, *et al.*, 2001; Aranha, *et al.*, 2007), des Melanoms (Torabian und Kashani-Sabet, 2005; Gartel, 2012) sowie einer Reihe von Lymphomentitäten, wie der Akuten T-cell Leukämie (Horie, *et al.*, 2006), dem Diffusen Großzelligen B-Zell Lymphom (Shaffer, *et al.*, 2002), dem Burkitt-Lymphom (Knecht, *et al.*, 2001) und dem Hodgkin Lymphom (Bargou, *et al.*, 1996; Bargou, *et al.*, 1997; Staudt, 2000; Schwarzer, *et al.*, 2012). Ein weiteres auffälliges Merkmal der Zellen des Hodgkin Lymphoms ist neben ihrer konstitutiven NF- κ B Aktivierung auch die aberrante Aktivierung von AP-1 (Mathas, *et al.*, 2002; Krappmann, *et al.*, 2004).

Eine Besonderheit des AP-1-Mitgliedes *JUN* ist dessen positive Autoregulation durch sein eigenes Genprodukt c-Jun. In Hodgkinzellen führt eine Deregulation der Expression von c-Jun zu einer Akkumulation dieses Proteins in der Zelle und zu einer veränderten Expression einer Vielzahl AP-1-abhängiger Genprodukte. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nur der *JUN* Promotor und dessen Aktivität in Hodgkinzellen genauer untersucht, sondern auch Faktoren angereichert und analysiert, die mit diesem Promotor assoziiert sind und eine mögliche Deregulation der Expression von c-Jun in den Hodgkinzellen bewirken können.

5.1 Hodgkinzellen zeigen eine charakteristische konstitutive NF- κ B und AP-1 Aktivität

Hodgkinzellen zeichnen sich durch eine verstärkte und persistente Aktivierung von NF- κ B und AP-1 gegenüber anderen Zellen aus (**Abbildung 6-A** links; Bargou, *et al.*, 1996). Die konstitutive NF- κ B Aktivität dieser Zellen ist im Wesentlichen geprägt durch nukleäres p50 und p52 und die verstärkte Prozessierung ihrer Vorläuferproteine p105 und p100 (**Abbildung 6-C**). Weiterhin auffällig ist die Beobachtung, dass der Transkriptionsfaktor p65, anders als bisher angenommen, hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist und nur geringe Mengen tatsächlich in den Kern translozieren. Dieser Befund stimmt mit früheren Beobachtungen überein (Bargou, *et al.*, 1997), bei denen durch Immunolokalisierung von RelA in Lymphknotenschnitten von Hodgkin-Lymphom Patienten eine deutliche Anfärbung des Zytoplasmas festgestellt wurde. Die Verteilung von RelA zwischen Zytosol und Kern wurde dabei jedoch nicht untersucht.

Die Faktoren RelB und c-Rel zeigen hingegen nicht nur eine heterogene Expressionsstärke in den verschiedenen Hodgkin-Zelllinien und den verwendeten Vergleichslinien, sondern auch eine ungleiche Verteilung zwischen Kern und Zytoplasma in den jeweils verwendeten Zelllinien. So fällt beispielsweise auf, dass auch RelB in fast allen Zelllinien verstärkt im Zytoplasma vorliegt. Ausnahmen sind hier die Hodgkinzelllinie L540 und die Vergleichszelllinie Raji, in denen RelB vorrangig im Kern zu finden ist. Wie bereits im Ergebnisteil (**Kapitel 4.1**) erwähnt, handelt es sich bei Raji um eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie

mit ebenfalls konstitutiver NF- κ B Aktivität. Dies mag auch die permanente Prozessierung von p100 zu p52 in dieser Zelllinie erklären.

Anders als die Hodgkinzellen zeigen Raji, wie auch die anderen Vergleichszelllinien, keine persistente Aktivierung von AP-1. Diese ist ausschließlich auf Hodgkin-Lymphom Zelllinien beschränkt und durch starke Überexpression von c-Jun und JunB und deren Lokalisierung im Kern geprägt. Die Expression von JunB ist ein NF- κ B-abhängiger Prozess. Die verstärkte Synthese von JunB in den Hodgkinzellen erklärt sich im wesentlichen aus der konstitutiven NF- κ B Aktivität, was durch Verwendung des Superrepressors I κ B α Δ N gezeigt wurde (**Abbildung 28-C**; Mathas, *et al.*, 2002; Krappmann, *et al.*, 2004). Der Promotor des *JUNB* Gens besitzt jedoch auch Bindesequenzen für AP-1 (Hazzalin und Mahadevan, 2002), was für eine Ko-regulation der JunB Expression durch NF- κ B und AP-1 spricht. So konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass JunB in 70Z/3 Zellen durch den AP-1-Superrepressor AFos im Westernblot herunterreguliert wird (Eva Kärger, Daten unpubliziert). Des Weiteren wird in RAW 264.7 Zellen JunB Stimulus-abhängig (nach 8 Stunden LPS Inkubation) an seinen eigenen Promoter und an eine 3'-regulatorische Sequenz rekrutiert (Eva Kärger, ChIP-Daten unpubliziert).

Auch JunD wird verstärkt in Hodgkinzellen exprimiert und in den Kern transloziert (**Abbildung 6-B**). Aber anders als bei c-Jun und JunB erfolgt eine schwache basale Expression von JunD auch in den Referenzlinien. Hier ist jedoch keine Bindung von AP-1 an das TRE-Element im EMSA nachweisbar (**Abbildung 6-A rechts**).

Während im EMSA unter Verwendung des TRE Bindemotives ein Vergleich der allgemeinen AP-1 Bindeaktivität unter verschiedenen Bedingungen oder in verschiedenen Zellen, durch Zu- oder Abnahme der Signalstärke analysiert wird, kann im Luciferase-Assay die transkriptionelle Aktivität eines Transkriptionsfaktors gemessen werden. Die Verwendung verschiedener Deletionsmutanten des *JUN* Promotors (Δ Jun1, Δ Jun2 und Δ Jun1+2) in diesem Testsystem zeigte, durch Inaktivierung der AP-1-Bindestellen deutlich, dass AP-1 in Hodgkinzellen die Transkription von c-Jun reguliert (**Abbildung 7-B**; Mathas, *et al.*, 2002). Hinweise auf die Autoregulation von c-Jun ergaben sich durch Supershiftanalysen im EMSA, die zeigten, dass der AP-1 Komplex in Hodgkinzellen auch c-Jun enthält (**Abbildung 18**). Vergleicht man die Aktivitäten des kurzen Wildtyp-Promotors (WTK; -283 bis +171) mit denen des langen Wildtyp-Promotors (WTL; -1600 bis +171), so zeigt sich kaum ein Unterschied in der basalen Transkriptionsaktivität, sowohl in der Hodgkinlinie L428, als auch in der Referenzlinie Namalwa. Dieser Befund zeigt, dass die Regulation der Expression von c-Jun hauptsächlich auf Bindemotive zurückzuführen ist, welche sich in der Region von -283 bis +171 befinden (**Abbildung 7-A und B**). Die basale Aktivität am WTK in L428 liegt dabei um 2,2-fach höher als in Namalwa (unbehandelt) und entspricht etwa der Aktivität im stimulierten Zustand von Namalwa (PMA, 3 Std.). Interessant ist, dass die basal erhöhte Aktivität in Hodgkinzellen nicht auf eine erhöhte MAP-Kinase Aktivität zurückzuführen ist (Mathas, *et al.*, 2002). Induziert man in Hodgkinzellen zusätzlich noch mit einem Stimulus wie z.B. PMA, die MAP-Kinase Kaskade, so kommt es zu einer weiteren Zunahme der AP-1 Aktivität am *JUN* Promotor (**Abbildung 7-B links**). In Hodgkinzellen weisen die MAP-Kinasen (JNK, ERK und p38) unter normalen Bedingungen keine Aktivität aufweisen, aber durch exogene Stimuli sehr wohl induzierbar und damit funktionell sind

(**Abbildung 7-B** links; Mathas, *et al.*, 2002). Möglicherweise werden die MAP-Kinasen durch einen NF- κ B-abhängigen Prozess inhibiert. Diskutiert werden in der Literatur **MAP-Kinase-Phosphatasen (MKP**, inaktivieren MAP-Kinasen durch Dephosphorylierung), wie zum Beispiel MKP-1, MKP-7 oder PAC-1, deren Expression durch NF- κ B kontrolliert wird (Guo, *et al.*, 1998; Krappmann, *et al.*, 2004; Chang, *et al.*, 2006; Wang, *et al.*, 2008). Eine Erhöhung der NF- κ B Aktivität kann, wie durch Krappmann und Kollegen gezeigt, durch exogene Stimuli in Hodgkinzellen nicht erzielt werden (Krappmann, *et al.*, 1999).

Eine genauere Analyse der Hodgkin-spezifischen AP-1 Aktivität erfolgte unter Verwendung von modifizierten Wildtyp-Promotoren. Dabei wurden die beiden AP-1 Bindestellen des *JUN* Promotors entweder einzeln oder zusammen durch Veränderung der Basensequenz modifiziert, so dass die Bindung von AP-1 an diese Motive unterbunden wurde (**Abbildung 7-A**; Δ Jun1, Δ Jun2 und Δ Jun1+2). Während durch die Verwendung des Konstruktes Δ Jun1+2 die AP-1 Aktivität komplett zum Erliegen kommt, lässt sich durch die anderen beiden Konstrukte eine genauere Aussage über die Spezifität der AP-1 Aktivität in Hodgkinzellen machen. So zeigt sich eine sehr starke Reduktion der AP-1 Aktivität, wenn die AP-1 ähnliche Jun1-Sequenz ausgeschaltet wird (Δ Jun1). Schaltet man hingegen die ATF-ähnliche Jun2-Sequenz aus (Δ Jun2), ist zwar auch hier eine Reduktion der AP-1 Aktivität zu beobachten, diese ist jedoch weniger stark als bei der Jun1-Sequenz. In der Referenzlinie Namalwa hingegen reduziert sich die AP-1 Aktivität für beide AP-1 Bindestellen in gleichem Maße. Dadurch wurde gezeigt, dass die Hodgkin-spezifische AP-1 Aktivität einen regulativen Effekt auf die c-Jun Expression über beide AP-1 Bindestellen im *JUN* Promotor ausübt, der Jun1 Sequenz jedoch der Hauptanteil an der Regulation zugeschrieben werden muss.

5.2 Reinigung und Charakterisierung spezifischer an den *JUN* Promotor gebundener Faktoren in Zellen des Hodgkin Lymphoms

Zur Aufklärung der Zusammensetzung des am *JUN* Promotor von Hodgkinzellen gebundenen AP-1 Komplexes aber auch zur Identifizierung von zusätzlichen gebundenen Faktoren, die eine Fehlregulation der c-Jun Expression in Zellen des Hodgkin Lymphoms bewirken können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine fünfstufige klassische chromatographische Aufreinigung von Hodgkin-spezifischen am *JUN* Promotor gebundenen Faktoren aus Kernextrakten entwickelt und durchgeführt. Es wurden Kernextrakte der Hodgkinlinie L428 und der Vergleichsline Namalwa unter exakt denselben Bedingungen vergleichend präpariert und analysiert. Die über den Anionenaustauscher DE-52 vorgereinigten Kernextrakte wurden anfänglich über den Kationenaustauscher SP-Sepharose getrennt (**Kapitel 4.2.1.1**). Die aktiven und jeweils zwischen den Trennungsgängen dialysierten und im EMSA getesteten Fraktionen durchliefen nun drei affinitätschromatographische Schritte mit zunehmender Spezifität für Faktoren die an dem *JUN* Promotor gebunden sind. Dabei diente die Heparin-Sepharose einer allgemeinen Anreicherung DNA-bindender Proteine (**Kapitel 4.2.1.2**). Da polymeres Heparin jedoch nicht nur die polyanionische Struktur von Nukleinsäuren simuliert sondern auch als Substratanalogon anderer Proteine fungieren kann, folgte diesem Schritt eine allgemeine Anreicherung DNA-bindender Proteine an doppelsträngiger DNA-Cellulose (**Kapitel 4.2.1.3**). Der letzte Schritt diente der Anreicherung von Faktoren, welche an den *JUN* Promotor gebunden sind. Zu diesem Zweck wurde ein zuvor optimierter und getesteter synthetischer und doppelsträngiger *JUN*

Promotor (JunPro78 siehe **Abbildung 9**) an Sepharose gekoppelt (**Kapitel 4.2.1.4**). Mit den hier verwendeten Trennungsgängen konnte eine Hodgkin-spezifische DNA-Bindeaktivität am *JUN* Promotor angereichert werden.

Die Optimierung des Wildtyp *JUN* Promotors war notwendig, da dieses DNA Fragment die einzige Möglichkeit zum Nachweis der Hodgkin-spezifischen AP-1 Aktivität war und damit nicht nur die Grundlage für den finalen Reinigungsschritt, sondern auch für die Nachweismethode der aktiven Fraktionen der verschiedenen Trennungsgänge, den EMSA. Wie bereits im **Kapitel 4.2** beschrieben, wurden dabei in einer Reihe von Vorstudien die DNA-Bindemotive SP-1, CTF sowie GATA aus diesem synthetischen Promotor ausgeschlossen, sowie große Linker-Regionen zwischen beibehaltenen Bindemotiven. Die Entfernung dieser Sequenzen basierte auf den Daten der Footprintanalyse von Peter Angel, *et al.*, 1987, und beinhaltet nur Sequenzen, für die keine Bindung von Proteinen unter TPA-Stimulation beobachtet wurde. Dass durch diese Optimierung mögliche Sequenzen entfernt wurden, die einen noch unbekannten Faktor der Regulation der verstärkten c-Jun Expression binden können, wurde hier in Kauf genommen, da der Vorteil einer eindeutigen Nachweismethode überwiegt. Der Vergleich verschiedener Hodgkin-Zelllinien mit Vergleichszelllinien in **Abbildung 10** zeigt deutlich ein Hodgkin-spezifisches Signal mit diesem synthetischen Promotor (JunPro78), welcher in einem zusätzlichen Experiment auch mit dem JunPro150 (150 bp des *JUN* Wildtyp Promotors) bestätigt wurde. JunPro150 erwies sich jedoch als weniger geeignet für die Darstellung klarer Signale im EMSA, und wurde daher nicht weiter verwendet.

Die massenspektrometrische Analyse der verschiedenen Komplexe ergab einerseits, dass die gereinigte Aktivität, wie erwartet, die Faktoren c-Jun, JunB und JunD enthielt. Diese dienten als interne Kontrolle und belegen, dass die Reinigung erfolgreich war. Neben diesen drei Faktoren wurden aber noch weitere Proteine angereichert, von denen einige in einen möglichen Zusammenhang mit der aberranten c-Jun Expression gebracht werden konnten, andere aber auch ausgeschlossen wurden (**Kapitel 4.2.2**). So wurden einerseits die Daten aus der Massenspektrometrie durch Westernblot-Analyse der gereinigten Extrakte bestätigt, andererseits auch eine Expressions- und Interaktionsanalyse durchgeführt, um festzustellen, ob das jeweilige zu untersuchende Protein in der Hodgkinzelllinie höher exprimiert wird als in der Vergleichszelllinie beziehungsweise ob eine physische Interaktion mit c-Jun stattfindet. Eine direkte Interaktion mit c-Jun könnte bei dem Autoregulationsmechanismus eine Rolle spielen. So ist beispielsweise die RNA-Helikase Ddx21 ein Protein, welches als Interaktionspartner von c-Jun beschrieben wurde (Westermarck, *et al.*, 2002; Holmstrom, *et al.*, 2008; Mialon, *et al.*, 2008). Die Interaktion des über die TAP-Methode (tandem affinity purification) angereicherten Faktors mit rekombinantem verkürzten c-Jun wurde von dieser Gruppe in zusätzlichen Interaktionsstudien verifiziert. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Koimmunpräzipitation mit verschiedenen getesteten kommerziellen Antikörpern, mit DE52 vorgereinigten Kernextrakten, keine Interaktion von Ddx21 mit c-Jun festgestellt werden. Da die oben erwähnte Gruppe jedoch auch eine Interaktion von Ddx21 mit DNA-gebundenem c-Jun nachgewiesen hat, besteht die Möglichkeit, dass diese Interaktion eventuell nur an der DNA stattfindet, und dass die über Immunopräzipitation nachgewiesene Interaktion auf das rekombinante überexprimierte c-Jun oder eventuelle Rest-DNA in den Kernextrakten zurückzuführen ist. Ein anderer Gesichtspunkt besteht darin, dass Ddx21 auch mit einem anderen Protein,

dem Proto-Onkogen DEK, sowie anderen Proteinen im so genannten WICH-Komplex (Chromatin Remodeling Complex) interagiert (Cavellan, *et al.*, 2006). DEK bindet sequenzunspezifisch an DNA und wurde in dieser Arbeit ebenfalls am *JUN* Promotor angereichert. Des Weiteren interagiert DEK auch mit dem Protein PARP-1 (Gamble und Fisher, 2007), welches in die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen involviert ist, aber auch als transkriptioneller Ko-Regulator, Modulator der Chromatinstruktur und als Verstärker der Transkription fungiert.

Das Protein DEK könnte beispielsweise über Ddx21 an den *JUN* Promotor rekrutiert werden (WICH-Komplex), da eine physikalische Interaktion von c-Jun mit Ddx21 an der DNA gezeigt werden konnte (vorliegende Daten und Westermarck, *et al.*, 2002). Weil sich die Expressionsdaten von DEK und Ddx21 in den Hodgkinzellen nicht von denen der Referenzlinien unterscheiden, mag eine verstärkte Anreicherung dieser Proteine in dem aus der Hodgkinzelllinie gereinigten Fraktions-Pool der JunPro78 Sepharose im direkten Zusammenhang mit der Überexpression von c-Jun stehen. Außer der Funktion von DEK beim Aufwinden superhelikaler DNA-Strukturen und seiner Chromatinassoziation (Hollenbach, *et al.*, 2002) ist über dieses Protein und eine mögliche Beteiligung an der Transkriptionsregulation noch recht wenig bekannt. Ähnlich verhält es sich mit Ddx21. Seine Funktion als RNA-Helikase steht im Vordergrund, aber auch eine Beteiligung an der Transkriptionsaktivierung von c-Jun wird nicht ausgeschlossen (Westermarck, *et al.*, 2002).

Neben den beiden Proteinen ATF-1 und ATF-2 wurde auch der Faktor ATF-3 am *JUN* Promotor angereichert. Während die Expressionsanalyse für ATF-1 und ATF-2 keine Unterschiede zwischen den Hodgkinzelllinien und den Vergleichszelllinien zeigte, wiesen Hodgkinzellen eine starke Überexpression von ATF-3 auf. Da die Proteine der ATF-Subfamilie, aufgrund ihrer Struktur ebenfalls der AP-1 Familie zugezählt werden, wurde dieses Protein und seine Funktion bei der Regulation der c-Jun Expression in dieser Arbeit genauer untersucht und bestätigt. Das wird im Detail im folgenden **Kapitel 5.3** diskutiert.

Des Weiteren wurden drei Proteine aus der NF- κ B Familie am *JUN* Promotor angereichert. In Bezug auf die konstitutive NF- κ B Aktivität der Hodgkinzellen war dieses Ergebnis von besonderem Interesse. Während c-Rel und RelB nur sehr schwache Signale im Westernblot des gereinigten Fraktionspools liefern, zeigte p52 ein auffallend starkes Signal. Die Untersuchungen zur speziellen Funktion von p52 bei der Hodgkin-spezifischen AP-1 Aktivität werden im **Kapitel 5.4** diskutiert.

Eine genauere Analyse der gereinigten Gesamtaktivität hinsichtlich ihrer Bindespezifität für die beiden AP-1 Bindestellen Jun1 und Jun2 im EMSA zeigte deutlich, dass die Proteine dieser Fraktionen nahezu vollständig spezifisch an die Jun1 Bindestelle des *JUN* Promotors binden und nur ein geringer Teil an die Jun2 Bindestelle. Dies wurde durch Vergleiche zwischen dem synthetischen *JUN* Promotor JunPro78-WT und den *JUN* Deletionsvarianten JunPro78- Δ Jun1 und JunPro78- Δ Jun2 gezeigt, wobei keine Restaktivität an JunPro78- Δ Jun1+2 (beide AP-1 Bindestellen inaktiv) nachzuweisen war. Dieses Ergebnis zeigt, dass offensichtlich die anderen Bindestellen des *JUN* Promotors (FP, NF-Jun, RSRF) entweder keinen der angereicherten Faktoren binden, oder deren Quantität unterhalb der Nachweisgrenze des EMSA liegt (**Abbildung 17**). Die Analyse im EMSA-Supershift ergab zusätzlich, dass die drei AP-1 Mitglieder c-Jun, JunB und JunD nicht nur Teil der gereinigten Aktivität waren, sondern dass JunB wahrscheinlich in einem

anderen Komplex an den *JUN* Promotor bindet, als auf der Standard-TRE Konsensussequenz (unterschiedliches Supershift-Verhalten siehe **Abbildung 18**). Weiterhin konnte auch bestätigt werden, dass ATF-3 Teil dieses Komplexes ist und an den *JUN* Promotor bindet.

5.3 ATF-3 bindet spezifisch an den *JUN* Promotor in Zellen des Hodgkin-Lymphoms, wird in diesen überexprimiert und reguliert die c-Jun Expression

ATF-3 wurde im Rahmen dieser Arbeit als ein weiterer Faktor neben c-Jun, JunB und JunD identifiziert, der als Mitglied der Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren an den *JUN* Promotor bindet. So wurden zwar auch geringe Mengen an ATF-1 und ATF-2 im selben Experiment angereichert (**Abbildung 16**), jedoch konnte für ATF-3 gezeigt werden, dass dieser Faktor in Hodgkinzellen nicht nur stark überexprimiert wird (**Abbildung 19-A** oben; Janz, *et al.*, 2006; Miyazaki, *et al.*, 2009), sondern auch ausschließlich im Kern lokalisiert ist (**Abbildung 19-A** unten; **Abbildung 20**). ATF-3 ist in der Literatur zwar nicht als klassisches NF- κ B Zielgen beschrieben, jedoch zeigten bereits Liang *et al.*, dass die Promotorregion von ATF-3 zwei potentielle NF- κ B Bindestellen besitzt (Liang, *et al.*, 1996). Etwas später beschrieben Miyazaki *et al.* die Verwendung von alternativen ATF-3 Promotoren (P1 und P2) in malignen Zellen und bei der Stressantwort. Dabei zeigten Sie, dass der alternative Promotor P1, der in malignen Zellen zur erhöhten Expression von ATF-3 führt, ebenfalls durch Bindestellen für NF- κ B gekennzeichnet ist (Miyazaki, *et al.*, 2009).

Im EMSA konnte gezeigt werden, dass ATF-3 eine Komponente der konstitutiven AP-1 Aktivität in Hodgkinzellen ist, und an beide AP-1 Bindestellen im *JUN* Promotor bindet (**Abbildung 19-D**). Bestätigt wurde das Vorhandensein von ATF-3 in dem Hodgkin-spezifischen AP-1 Komplex durch die Verwendung von Supershift Antikörpern gegen ATF-3 im EMSA (**Abbildung 19-C und Abbildung 19-D**). So zeigte dieses Experiment, dass der AP-1 Komplex aus Hodgkinzellen an der ATF-ähnlichen Jun2/URE2 Bindestelle des *JUN* Promotors zu einem großen Teil durch ATF-3 geprägt ist, da durch den Supershift Antikörper das spezifische AP-1 Signal stark reduziert wurde (**Abbildung 19-D** unten). Die AP-1-ähnliche Jun1/URE1 Bindestelle hingegen wird zwar auch von ATF-3 gebunden (**Abbildung 19-D** oben), wird jedoch durch andere Faktoren, wie beispielsweise c-Jun, JunB und JunD dominiert (**Abbildung 18**). Dies wird dadurch ersichtlich, dass es im EMSA durch den ATF-3 Supershift Antikörper kaum zu einer Reduktion des Signals der AP-1 Aktivität kommt.

Wie bereits in **Kapitel 4.3** erwähnt, handelt es sich bei ATF-3 um einen Transkriptionsfaktor dessen Funktion häufiger in Zusammenhang mit einer Repression als mit der Aktivierung der Transkription gebracht wird (Chen, *et al.*, 1994; Liang, *et al.*, 1996). Dabei wird vermutet, dass ATF-3 inhibitorische Kofaktoren am Promotor stabilisiert. Aktivierend auf die Transkription hingegen sollen dabei verschiedene natürlich vorkommende Isoformen von ATF-3 wirken (Δ Zip), denen die Möglichkeit zur Bindung an das ATF/CRE Motiv fehlt. Diese ATF-3- Δ Zip Varianten besitzen jedoch noch die Eigenschaft mit anderen Proteinen, unter anderem auch der AP-1 und ATF Familie, physikalisch zu interagieren, und auch die Fähigkeit inhibitorische Faktoren vom Promotor fernzuhalten. Sollte die Funktion von ATF-3 (volle Länge) am *JUN* Promotor ebenfalls reprimierender Natur sein, so wäre das Vorhandensein solcher ATF-3- Δ Zip-Varianten eine mögliche Erklärung für die verstärkte Expression von c-Jun. Der Nachweis von alternativ

gespleißten Isoformen ergab jedoch, dass ausschließlich ATF-3 (volle Länge) und keine weiteren Isoformen dieses Proteins in Hodgkinzellen wie auch den verwendeten Vergleichslinien synthetisiert wird (**Abbildung 19-B**). Sollte das überexprimierte ATF-3 einen Effekt auf die Expression von c-Jun in den Hodgkinzellen haben, so scheidet eine aktivierende Regulation des *JUN* Promotors durch die ATF-3-Isoformen aus und ATF-3 (volle Länge) selbst übt möglicherweise diesen aktivierenden Effekt aus. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde ATF-3 mittels siRNA in der Hodgkinzelllinie L428 herunterreguliert und die Expression von c-Jun aber auch JunB und JunD analysiert. Es konnte dabei gezeigt werden, dass ein Defizit an ATF-3 nicht nur zu einer verminderten Expression von c-Jun, sondern auch von JunB führt, während die Expression von JunD offensichtlich nicht durch ATF-3 reguliert wird (**Abbildung 22**). Damit ist ATF-3 ein Aktivator der Expression von c-Jun und JunB unter den Bedingungen, wie sie in den Hodgkinzellen vorherrschen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass es durch die verstärkte Expression von c-Jun, JunB und ATF3 in den Hodgkinzellen zu einer Veränderung der Konzentration der verschiedenen AP-1 Faktoren im Kern kommt. Die daraus resultierende Verschiebung des Gleichgewichtes dieser Transkriptionsfaktoren führt zu einer Veränderung der Heterodimer-Zusammensetzung des AP-1 Komplexes (Kompetition auf Ebene der Protein-Interaktion). Dadurch besteht die Möglichkeit, dass auch weniger affine AP-1 Komplexe aufgrund ihrer erhöhten Konzentration in der Zelle an spezielle AP-1- oder ATF -ähnliche Bindemotive binden können. Dies wiederum führt dazu, dass der unter normalen Bedingungen vorherrschenden AP-1 Komplex von dem jeweiligen DNA-Bindemotiv verdrängt werden kann (Kompetition auf Ebene der Protein-DNA-Interaktion). Damit kann diese veränderte AP-1 Heterodimer-Komposition einen zusätzlichen Anteil an der Hochregulation der Expression von c-Jun haben, und sich der normalerweise reprimierende Effekt von ATF-3 in den Hodgkinzellen in einen aktivierenden Effekt wandeln.

Eine Sequenzanalyse des *JUN* Promotors ergab, neben den bereits bekannten über DNase I-Footprintanalyse identifizierten Bindemotiven (Angel, *et al.*, 1987), das Vorhandensein eines GATA-Motives in der Region von -5 bis -33. Die Expressionsanalyse verschiedener GATA-Faktoren zeigte zusätzlich, dass GATA3 in Hodgkinzellen überexprimiert wird, hinsichtlich der GATA Sequenz im *JUN* Promotor jedoch keine besondere Rolle zukommt (**Kapitel 4.2**). Die verstärkte Expression von GATA-3 in den Hodgkinzellen ist auf zwei Bindestellen für NF- κ B an den Positionen -532 und -88 sowie drei Bindestellen für Notch-1 an den Positionen -3532, -153 und -144 relativ zum Translationsstartpunkt zurückzuführen (Stanelle, *et al.*, 2010). Neben der konstitutiven NF- κ B Aktivität, weisen Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen auch eine konstitutive Notch-1 Aktivität auf (Jundt, *et al.*, 2002; Jundt, *et al.*, 2004).

Eine weitere nicht zu vernachlässigende Tatsache ist die, dass sämtliche MAP-Kinasen, welche normalerweise zur Aktivierung von AP-1 führen in Hodgkinzellen nicht aktiviert sind (Mathas, *et al.*, 2002). Hier würde theoretisch die Möglichkeit bestehen, dass die inaktiven unphosphorylierten AP-1 Komponenten zusammen mit dem überexprimierten ATF-3 den unter Normalbedingungen reprimierenden Effekt von ATF-3 entweder aufheben oder sogar in einen aktivierenden Effekt umwandeln. Diese Szenarien sind jedoch nur rein hypothetischer Natur und zusammenfassend lässt sich hier anhand der Daten festhalten, dass konstitutiv hoch-reguliertes ATF-3 in Hodgkinzellen nicht nur physikalisch mit c-Jun interagiert (**Abbildung 21**) sondern auch ausschließlich im Kern lokalisiert (**Abbildung 20**) einen Komplex mit anderen AP-1

Komponenten am *JUN* Promotor bildet (**Abbildung 19-C** und **Tabelle 1**). Eine Herunterregulation von ATF-3 mittels siRNA führt zu einer Herunterregulation der beiden AP-1 Mitglieder c-Jun und JunB. Damit fungiert ATF-3 in Hodgkinzellen als ein Aktivator der Expression von c-Jun und JunB. Janz und Kollegen (Janz, *et al.*, 2006) zeigten überdies, dass eine lang anhaltende Herunterregulation von ATF-3 in Hodgkinzellen das Überleben und das Wachstum der Zellen stark beeinträchtigt. Möglicherweise ist die Überexpression von ATF-3 und die daraus resultierende AP-1 Aktivität eine weitere mögliche Überlebensstrategie der Zellen des Hodgkin-Lymphoms neben der konstitutiven NF- κ B Aktivität.

5.4 Die konstitutive NF- κ B Aktivität in Hodgkin-Zellen ist eine Ursache für die persistente Aktivierung von AP-1 in diesen Zellen

Ein weiteres überraschendes und interessantes Ergebnis aus der Anreicherung von Proteinen, welche am *JUN* Promotor von Hodgkinzellen binden, war der Nachweis von Proteinen aus der NF- κ B Familie von Transkriptionsfaktoren. Besonders auffällig dabei war, neben geringen Mengen an c-Rel und RelB, eine sehr starke Anreicherung von p52 (**Abbildung 16**).

Die anhaltende Prozessierung von p100 zu p52 und die Tatsache, dass p52 ein wesentlicher Bestandteil der konstitutiven NF- κ B Aktivität von Hodgkinzellen ist, ist hinreichend bekannt (Nonaka, *et al.*, 2005 und **Abbildung 6**). Es wurde lange angenommen, dass der alternative Weg der NF- κ B-Aktivierung eine untergeordnete Rolle in den Hodgkinzellen spielt. Die hier vorliegenden Daten zeigen aber, dass p50 und p52 die dominanten Kernkomponenten der NF- κ B Aktivität aller untersuchten Hodgkinzellen sind. Der Transkriptionsfaktor p65 befindet sich bei allen untersuchten Hodgkinzelllinien zu einem weitaus geringeren Anteil im Kern. Der Großteil an p65 ist im Zytoplasma lokalisiert. Die verstärkte Prozessierung von p105 zu p50 und von p100 zu p52 ist Hodgkin-spezifisch, während p65 in ähnlichen Mengen auch von den Referenzlinien produziert wird und seine Kern-Zytoplasma Verteilung mit der von Hodgkinzellen vergleichbar ist. Die Expressionsstärken, sowie die intrazellulären Verteilungen der anderen NF- κ B Komponenten (c-Rel und RelB) sind heterogen und lassen kein eindeutiges Muster erkennen.

Damit zeichnet sich ab, dass p52 möglicherweise nicht nur eine weitaus wichtigere Rolle bei der konstitutiven NF- κ B Aktivität der Hodgkinzellen zukommt, als bisher angenommen wurde, sondern dass es, aufgrund der Bindung am *JUN* Promotor, auch eine wichtige Funktion bei der Aktivierung von AP-1 in diesen Zellen hat.

5.4.1 Die Expression vieler Zytokine, welche von Hodgkin-Zellen verstärkt sekretiert werden, wird durch NF- κ B und AP-1 ko-reguliert

Es ist bekannt, dass die Expression einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen unter der Kontrolle von NF- κ B steht (Referenzen und Beispiele sind in **Tabelle 2, Kapitel 4.4.1** aufgeführt). Die konstitutive NF- κ B- und AP-1-Aktivität in den Hodgkinzellen hat nicht nur eine Auswirkung auf das Expressionsmuster verschiedener intrazellulärer Proteine sondern auch auf die Expression von Proteinen, die von der Zelle sezerniert werden.

Bei einer Kultivierung von Zellen wie HEK-293 oder HeLa mit Kulturüberständen verschiedener Hodgkinzelllinien zeigte sich nicht nur eine starke Aktivierung von NF- κ B sondern auch von AP-1 im EMSA Experiment (**Abbildung 23**). Beide Signalwege werden dabei innerhalb von ein bis zwei Stunden, abhängig vom Kulturüberstand der verwendeten Hodgkin-Spenderzellen, induziert. Auffällig bei der AP-1 Aktivität ist ein anfängliches Absinken bei 30 Minuten, verglichen mit der basalen Aktivität im unstimulierten Zustand, und darauf folgend erst ein Anstieg beginnend bei 60 Minuten. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die Expressionsdaten von verschiedenen AP-1 Mitgliedern in HEK-293 (**Abbildung 26**, HEK-293-Mock-Zellen), so lässt sich dieser Befund dadurch erklären, dass zwischen 60 und 120 Minuten eine verstärkte Synthese, insbesondere von c-Jun und ATF-3, einsetzt. Möglicherweise wird der zum Zeitpunkt Null an die DNA gebundene AP-1 Komplex nach Stimulation durch einen andersartig zusammengesetzten AP-1 Komplex von der DNA verdrängt und ersetzt.

Die Analyse der Kulturüberstände verschiedener Hodgkinzelllinien und Referenzzelllinien mit dem RayBio[®] Human Inflammation Antibody Array 3 ergab eine Anzahl von Hodgkin-spezifisch sekretierten Zytokinen, die sowohl als NF- κ B- als auch als AP-1-Zielgene bekannt sind (**Tabelle 3**). Diese Faktoren selbst können auch wieder eine Aktivierung von NF- κ B und/oder AP-1 verursachen. Es sei an dieser Stelle bemerkt, dass das hier verwendete Array, aufgrund seiner Größenbegrenzung, nur eine geringe Auswahl von sezernierten Faktoren zu identifizieren vermag. Jedoch zeigte diese kleine Auswahl deutlich, dass Hodgkinzellen spezifisch und verstärkt verschiedene Mitglieder der Interleukin-Familie wie IL-6, IL-8 und IL-13 sezernieren. Betrachtet man jedoch die vergleichsweise recht große Familie der Interleukine und in diesem Zusammenhang solche, deren Expression durch NF- κ B reguliert wird, so ist erstaunlich, dass Interleukine wie IL-1 α und IL-1 β nur von einer beziehungsweise zwei Hodgkinlinien in sehr geringen Mengen sezerniert werden (IL-1 α von L591; IL-1 β von HDLM-2 und KMH-2). Diesen Befund belegen auch die Daten von McKenzie, *et al.*, 1992. Weitere Interleukine deren Expression in anderen Zelltypen durch NF- κ B reguliert wird, wie zum Beispiel IL-2, IL-11, IL-15 und IL-17 (siehe **Tabelle 2**) werden von Hodgkinzellen überhaupt nicht sezerniert (Daten in **Tabelle 3** nicht aufgeführt) und bis auf IL-15 auch nicht exprimiert (vgl. Hinz, *et al.*, 2002 und Küppers, *et al.*, 2003).

Im Zusammenhang mit der verstärkten Sekretion von IL-6 konnte festgestellt werden, dass die Hodgkinzellen auch eine lösliche Form des IL-6 Rezeptors (IL-6sR) freisetzen. Diese lösliche Form des IL-6 Rezeptors ist wichtig für das „IL-6-trans-signaling“, also die Aktivierung durch IL-6 von Zellen, die selbst keinen IL-6-Rezeptor besitzen, aber auf ihrer Zelloberfläche den Interleukin-6-Signaltransducer (IL6ST) exprimieren (Rose-John und Neurath, 2004). Dieser ist für eine Signalweiterleitung des IL-6 Signals in das Zell-Innere essentiell (Hibi, *et al.*, 1990; Yamaguchi, *et al.*, 2008). Affimetrixdaten von Küppers, *et al.*, 2003 zeigen, dass die mRNA von IL6ST in keiner der von ihnen untersuchten Hodgkinlinien synthetisiert wird. Möglicherweise ist die unterdrückte Expression IL-6ST eine Strategie der Hodgkinzellen zur Inhibition der durch IL-6 induzierten Signalweiterleitung, die neben der potenten Aktivierung des JAK/STAT Signalweges auch zu einer Induktion des JNK/AP-1 Signalweges führen würde (Yamaguchi, *et al.*, 2008).

Cattaruzza und Kollegen zeigten, dass sowohl IL-7 als auch IL-7R von Hodgkinzellen exprimiert wird (IL-7 befindet sich nicht auf dem RayBio[®] Human Inflammation Antibody Array 3) und dass IL-7 unter anderem

auch die Sekretion von IL-6 stimuliert. Eine Depletierung von IL-7 führt zu einer signifikanten Inhibition der basalen Proliferation von Hodgkinzellen (Cattaruzza, *et al.*, 2009).

Tang und Kollegen beschreiben des Weiteren eine verstärkte Expression von IL-6, induziert durch das Chemokin RANTES (CCL5), welches ebenfalls sehr stark von allen Hodgkinzellen sezerniert wird (**Tabelle 3** und Tang, *et al.*, 2010). Eine Stimulation von Zellen mit RANTES führt dabei zu einer verstärkten Expression von c-Jun. Dieses bindet wiederum als AP-1 Komplex an den *IL6* Promotor und erhöht dabei die IL-6-Expression (Tang, *et al.*, 2010). Besonders interessant ist auch die Regulation der Expression von RANTES in Endothelzellen. Marfaing-Koka und Kollegen beschreiben hier eine erhöhte Expression von RANTES induziert durch TNF α plus IFN γ und eine Inhibition durch IL-13 (Marfaing-Koka, *et al.*, 1995). In Hodgkinzellen beobachtet man eine sehr starke Sekretion von RANTES. Weder TNF α noch IFN γ werden in nachweisbaren Mengen in den Kulturüberständen der Hodgkinzellen gefunden (**Tabelle 3**), obwohl TNF α eines der klassischen NF- κ B Zielgene ist (Collart, *et al.*, 1990; Shakhov, *et al.*, 1990). Auf der anderen Seite sezernieren diese Zellen verstärkt IL-13, was hier offenbar nicht zur Inhibierung der RANTES-Expression führt. Diese Konstellation unterscheidet sich von den von Marfaing-Koka, *et al.*, 1995 erhaltenen Befunden für die RANTES Expression in Endothelzellen. Möglicherweise fungieren in Hodgkinzellen die konstitutive Aktivierung von AP-1 und NF- κ B als eine Art Bypass der stimulusinduzierten Expression von RANTES und dominieren diese.

Die Expression von IL-13 wird unter anderem durch das von Hodgkinzellen verstärkt sekretierte TGF- β 1 reguliert (Roberts, *et al.*, 2005). IL-13 besitzt jedoch auch die Fähigkeit, abhängig vom zellulären Kontext, einerseits den TGF- β 1 Signalweg zu inhibieren (Shinozaki, *et al.*, 2010), andererseits aber auch die Expression von TGF- β 1, vermittelt über den IL-13R α -2, zu fördern (Fichtner-Feigl, *et al.*, 2007). Weiterhin schreiben Hardy und Kollegen IL-13 eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Sekretion von Activin A, einem weiteren Vertreter der TGF- β Superfamilie, zu (Hardy, *et al.*, 2010).

Ein weiterer Faktor, welcher sehr stark von den Hodgkinzellen, nicht jedoch von den Vergleichszellen, sezerniert wird, ist das Lymphotoxin- α (LTA, TNF- β , **Tabelle 3**). Dieser Befund ist insofern interessant, als man in Hodgkinzellen eine verstärkte Prozessierung von p100 zu p52 beobachtet und diese unter anderem durch die Aktivierung des Lymphotoxin- β Rezeptors durch Heterotrimere des Lymphotoxins induziert wird (LT α_1/β_2 ; Yin, *et al.*, 2001; Müller und Siebenlist, 2003; Yilmaz, *et al.*, 2003). Die Depletierung von Lymphotoxin- α im Kulturüberstand der Hodgkinzelllinie L428 durch einen neutralisierenden Antikörper führte dazu, dass nach einer Inkubation der L428-Überstände mit HEK-293 Zellen sowohl die induzierte NF- κ B als auch die induzierte AP-1 Aktivität, welche normalerweise beobachtet wird, fast völlig unterdrückt wird. Auf die Hodgkinzellen selbst hat die Depletierung von Lymphotoxin- α nur einen geringen Effekt. Hier zeigte sich nur eine marginale Verringerung der NF- κ B und AP-1 Aktivität in L428 im EMSA (**Abbildung 24**). Diese Befunde zeigen einerseits den starken Einfluss von Lymphotoxin- α nicht nur auf die Induktion von NF- κ B sondern auch auf AP-1 in HEK-293, andererseits spielt dieser Faktor in Hodgkinzellen offenbar eine untergeordnete Rolle in Hinsicht auf die autokrine Stimulierung der Aktivitäten von NF- κ B und AP-1. Möglicherweise lässt sich durch Depletierung nur eines Faktors in den Kulturüberständen der Hodgkinzellen weder die NF- κ B noch die AP-1 Aktivität der Hodgkinzellen selbst effektiv beeinflussen. So ist

Lymphotoxin- α nicht das einzige Zytokin, welches die Prozessierung von p100 stimuliert. Es werden beispielsweise auch CD40 und CD40L verstärkt von Hodgkinzellen produziert (Hinz, *et al.*, 2001; Clodi, *et al.*, 2002) und vermögen ihrerseits ebenfalls die Prozessierung von p100 zu induzieren (Coope, *et al.*, 2002). Eine Induktion dieser Prozessierung über den BAFF-Rezeptor erfolgt in Hodgkinzellen nicht (Nakamura, *et al.*, 2005). Die Aktivierung des Lymphotoxin- β Rezeptors durch Heterotrimere des Lymphotoxins induziert unter anderem auch die Genexpression von Interleukin-8, welches - wie oben bereits beschrieben - ebenso von den Hodgkinzellen verstärkt in das Kulturmedium abgegeben wird (Chang, *et al.*, 2002).

Ferner waren die Befunde zur Sekretion von TNF α und MIP-1 α interessant. Bei beiden Proteinen handelt es sich um klassische NF- κ B Zielgene (siehe **Tabelle 2**), von denen angenommen werden könnte, dass diese von Zellen mit einer persistenten Aktivierung von NF- κ B verstärkt sekretiert werden. Jedoch konnte in keinem der Kulturüberstände der Hodgkinzellen TNF α nachgewiesen werden, während eine marginale Sekretion von MIP-1 α nur durch HDLM-2 und L591 erfolgt. Eine denkbare Ursache für das Fehlen dieser beiden Faktoren, wie auch der oben schon erwähnten Interleukine, deren Expression durch NF- κ B reguliert wird, könnte darin zu suchen sein, dass es sich bei den verwendeten Kulturüberständen um die einer 24 Stunden Kultur handelt. Möglicherweise kommt es zu einem späteren Zeitpunkt zu einer stärkeren Anreicherung einiger Faktoren im Kulturüberstand. Eine anderer Grund könnte jedoch auch darin bestehen, dass sich die konstitutive NF- κ B Aktivität der Hodgkinzellen in der Zusammensetzung der funktionellen Homo- oder Heterodimere von der einer induzierten NF- κ B Aktivität unterscheidet, und es dadurch auch zu einem veränderten Expressionsmuster der NF- κ B Zielgene kommt. Die Identifizierung vieler bekannter NF- κ B Zielgene erfolgte nämlich meist nach Stimulation geeigneter Zellen mit starken NF- κ B Induktoren wie zum Beispiel LPS, oder nach Herunterregulation von NF- κ B durch den Superrepressor I κ B α Δ N (Collart, *et al.*, 1990; Shakhov, *et al.*, 1990; Krappmann, *et al.*, 2004).

Zusammenfassend lässt sich zur Auswertung der Daten des RayBio[®] Human Inflammation Antibody Array 3 sagen, dass Hodgkinzellen eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sezernieren, deren Expression durch NF- κ B, beziehungsweise in einigen Fällen auch durch ein kooperatives Zusammenspiel von NF- κ B und AP-1 reguliert wird. Nicht alle mit Hilfe des Arrays nachweisbaren Faktoren, die bekannte NF- κ B-Zielgene sind, werden auch tatsächlich von den Hodgkinzellen sezerniert. Ferner konnte festgestellt werden, dass einige dieser sezernierten Faktoren wieder zu einer Aktivierung von NF- κ B wie auch AP-1 führen, jedoch ist die NF- κ B Aktivität der Hodgkinzellen bereits maximal und kann durch exogene Stimuli nicht weiter erhöht werden (Krappmann, *et al.*, 1999). Dies könnte auch erklären, warum die Depletion nur eines Faktors (TNF- β) in den Hodgkin-Kulturüberständen keinen Effekt auf die anhaltende Aktivierung von NF- κ B in den Hodgkinzellen zeigt (**Abbildung 24**).

Die Aktivierung der Signalkaskaden zur Aktivierung von AP-1 wird offenbar durch einen NF- κ B-abhängigen Prozess inhibiert. In diesem Zusammenhang wurden hier bereits verschiedene MAP-Kinase-Phosphatasen (MKP) diskutiert, deren Expression durch NF- κ B reguliert wird, wie zum Beispiel MKP-1, MKP-7 oder PAC-1 (Guo, *et al.*, 1998; Krappmann, *et al.*, 2004; Chang, *et al.*, 2006; Wang, *et al.*, 2008). Diese Inhibition der Phosphorylierung ist offenbar effektiv genug eine Aktivierung der MAP-Kinasen durch die zelleigenen sezernierten Stimulatoren zu blockieren. Werden Hodgkinzellen jedoch zusätzlich mit TNF- α

oder PMA stimuliert, so beobachtet man eine Phosphorylierung der MAPK-Signalwege (Mathas, *et al.*, 2002). Dass diese Inhibition der MAPK-Phosphorylierung durch einen NF- κ B-abhängigen Prozess erfolgt belegen eigene Untersuchungen, bei denen Hodgkinzellen stabil mit dem Superrepressor I κ B α Δ N transfiziert wurden. Diese Zellen zeigten eine persistente Phosphorylierung von JNK (**Abbildung 28-D**).

Die Auswahl der in **Tabelle 3** aufgeführten Faktoren und deren Analyse verdeutlicht die Komplexität der exokrinen Stimulation, sowie ihre Auswirkung auf verschiedene Zielgene, zu denen auch wieder verschiedene Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine gehören. Die Expression der meisten durch Hodgkinzellen verstärkt sezernierten Faktoren wird durch NF- κ B und AP-1 ko-reguliert. Diese Faktoren besitzen das Potential den NF- κ B- und AP-1-Signalweg auch zu aktivieren (**Abbildung 23**). Die Wirkung der sekretierten Zytokine richtet sich dabei wahrscheinlich weniger auf die Hodgkinzellen selbst, sondern auf die Immunzellen, die verstärkt in den Lymphknoten von Hodgkinpatienten beobachtet werden.

5.4.2 Der mit dem *JUN* Promotor interagierende Transkriptionsfaktor NF- κ B/p52 spielt eine entscheidende Rolle bei der persistenten Aktivierung von AP-1 in den Hodgkinzellen

Wie in **Kapitel 4.1** beschrieben, ist die konstitutive NF- κ B Aktivität in Hodgkinzellen im Wesentlichen geprägt durch nukleär lokalisiertes p50 und p52 sowie eine verstärkte Prozessierung ihrer Vorläuferproteine p105 und p100 (**Abbildung 6-C**). Weiterhin auffällig war die Beobachtung, dass p65 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist und nur geringe Mengen tatsächlich in den Kern translozieren. Damit scheint das klassische Heterodimer p50/p65 eine eher untergeordnete Rolle bei der konstitutiven NF- κ B Aktivität der Hodgkinzellen zu spielen und das bisher eher weniger beachtete p52 an Wichtigkeit zu gewinnen. Ferner konnte bei der Auswertung der Ergebnisse aus dem RayBio[®] Human Inflammation Antibody Array 3 (**Kapitel 5.4.1**) festgestellt werden, dass einige Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine, deren Expression unter der Kontrolle von NF- κ B steht, zwar von Hodgkinzellen exprimiert (Hinz, *et al.*, 2002 und Küppers, *et al.*, 2003) nicht jedoch sezerniert werden. Dabei wurde bereits die Vermutung angestellt, dass sich die konstitutive NF- κ B Aktivität der Hodgkinzellen wohlmöglich in ihrer Dimerzusammensetzung von der einer induzierten NF- κ B Aktivität unterscheidet und es so zu einem veränderten Expressionsmuster der NF- κ B Zielgene kommen kann.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit NF- κ B/p52 als ein Faktor identifiziert, der gebunden am *JUN* Promotor offenbar an der Regulation der Expression von c-Jun beteiligt ist (**Kapitel 4.2.2** und **Abbildung 16**). Inwieweit p52 tatsächlich die Expression von c-Jun reguliert, wurde einerseits durch die Überexpression von p52 in HEK-293 gezeigt und auf der anderen Seite durch die Herunterregulation von p52 in Hodgkinzellen bestätigt.

5.4.2.1 Eine ektopische stabile Expression von NF- κ B/p52 resultiert in einer Hodgkin-Zell-ähnlichen AP-1 Expression in HEK-293

Um die Rolle von p52 in Bezug auf die Expression verschiedener Mitglieder der AP-1 Familie genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zelllinie HEK-293 verwendet. HEK-293 exprimieren im

unstimulierten Zustand p100, zeigen jedoch keine Prozessierung zu p52. Nach der Überexpression von NIK oder IKK α ist die Prozessierung von p100 zu p52 jedoch nachweisbar (Senftleben, *et al.*, 2001; Coope, *et al.*, 2002; Müller und Siebenlist, 2003). Damit stellt diese Zelllinie die optimale Grundlage dafür dar, ein System mit persistenter p100 Prozessierung zu simulieren, in dem p52 ektopisch stabil exprimiert wird. Eine Prozessierung von p100 zu p52 könnte in HEK-293 zwar auch durch eine Stimulation mit Lymphotoxin oder anderen den nicht-kanonischen Signalweg aktivierenden Agentien induziert werden, hätte jedoch zur Folge, dass damit neben dem klassischen NF- κ B Signalweg auch der AP-1 Weg induziert würde. Ein selektiver Effekt der p52 Expression auf die Expression verschiedener Mitglieder der AP-1 Familie, wie auch anderer potentieller p52 Zielgene, könnte also durch eine Stimulation mit physiologischen Stimuli nicht untersucht werden. Zur Stimulation der p52 exprimierenden HEK-293 Zellen wurde daher Hodgkin-Kulturüberstand eingesetzt, da dieser, wie in **Kapitel 4.4.1** beschrieben, zu einer starken NF- κ B und AP-1 Aktivierung führt (**Abbildung 23**). Das Ziel der Stimulation mit dem Kulturüberstand der Hodgkinzellen war es, ein ähnliches Expressionsmuster von NF- κ B und AP-1 in den HEK-293-Zellen zu erzielen. Dieser Cocktail an Hodgkin-spezifischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren führt dabei zu einer parallelen Ko-Stimulation verschiedener Signalwege, die unter anderem auch zu einer Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führen. Mit diesem System sollte die Abhängigkeit der AP-1 Aktivierung von p52 genauer untersucht werden.

Der Transkriptionsfaktor p52 zählte zu den auffälligsten Faktoren, für die eine Assoziation mit dem *JUN* Promotor nachgewiesen wurde (**Abbildung 16**). Mit Hilfe des Modells der ektopisch p52 exprimierenden HEK-293 sollte der Einfluss von p52 auf die AP-1 Aktivität geprüft werden. Im EMSA zeigte sich, dass bereits die Expression von p52 zu einer erhöhten AP-1 Aktivierung führt. Eine Stimulation mit Hodgkin-Kulturüberständen zeigte überdies auch eine deutlich induzierte Zunahme der AP-1 Aktivität bei den HEK-293-p52-Zellen im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen (**Abbildung 25-A**). Die Analyse der Expression verschiedener AP-1 Mitglieder zeigte deutlich, dass die basal erhöhte AP-1 Aktivität in HEK-293-p52-Zellen mit einer gesteigerten Expression von c-Jun und dem ebenfalls in dieser Arbeit als *JUN* Promotor assoziierten Faktor identifiziertem ATF-3 einhergeht. JunB und JunD zeigten hingegen keine erhöhte basale Expression (**Abbildung 26**).

Hinsichtlich der Induzierbarkeit durch die Kulturüberstände der Hodgkinzellen zeigte sich bereits bei HEK-293-Mock-Zellen ein starker Anstieg der Expression von c-Jun und ATF-3, welche sein Maximum bei zwei Stunden nach Stimulation fand und bei späteren Zeitpunkten bis 24 Stunden nach Stimulation gleichbleibend bei etwa der Hälfte des Maximalwertes lag. In HEK-293-p52-Zellen zeigte sich für die c-Jun Expression nach Stimulation, dass das Expressionsniveau der jeweiligen Zeitpunkte verglichen mit HEK-293-Mock-Zellen erhöht war, aber ebenfalls nach zwei Stunden sein Maximum fand und anschließend für spätere Zeitpunkte gleichbleibend auf etwa die Hälfte dieses Wertes absank (**Abbildung 26**). Das Verhalten in der Expression von c-Jun konnte auch unter Verwendung eines Wildtyp *JUN* Promotors in einer Reporteragen Analyse im Dual-Luciferase-Assay quantitativ bestätigt werden (**Abbildung 27**). Das Expressionsniveau von ATF-3 veränderte sich, verglichen mit den jeweiligen Zeitpunkten bei HEK-293-Mock-Zellen, in HEK-293-p52-Zellen nach Stimulation nicht (**Abbildung 26**). Damit ist p52 nicht nur involviert in der Regulation der

basalen Expression von c-Jun und ATF-3 sondern auch in der Regulation einer Stimulus-induzierten Expression von c-Jun durch die Kulturüberstände der Hodgkinzellen, jedoch nicht in der von ATF-3.

Im Westernblot konnte kein Unterschied zwischen der basalen Expression von JunB in HEK-293-Mock-Zellen und HEK-293-p52-Zellen festgestellt werden (**Abbildung 26**). Umso interessanter war die Beobachtung einer starken Stimulus-induzierten Expression von JunB in HEK-293-p52-Zellen. Diese ist gekennzeichnet durch die Expression von zwei JunB Isoformen zwei Stunden nach Stimulation mit den Kulturüberständen der Hodgkinzellen. Von 4 bis 24 Stunden ist die kleinere Isoform von JunB deutlich schwächer, wobei hier das Expressionsniveau der größeren, langsamer laufenden, Isoform bis 8 Stunden konstant bleibt und sich bei 24 Stunden reduziert. Damit scheint p52 zwar keine Rolle bei der basalen Expression von JunB zu spielen, dafür jedoch eine wichtige regulative Rolle bei seiner Stimulus-induzierten Expression. Chiu und Kollegen (Chiu, *et al.*, 1989) beschreiben JunB einerseits als einen Negativregulator der c-Jun Expression, andererseits wurde beschrieben, dass JunB einen aktivierenden Effekt auf Promotoren haben kann, sofern diese mehrere AP-1 Erkennungssequenzen enthalten (Chiu, *et al.*, 1989). Da der *JUN* Promotor zwei AP-1-Bindestellen besitzt, wäre JunB prinzipiell als Positivregulator der c-Jun Expression denkbar. Betrachtet man jedoch in **Abbildung 26** die Expressionsstärke von c-Jun im Vergleich zu JunB, so korreliert die Zunahme der Expression der größeren JunB Isoform mit einer Abnahme der c-Jun Expression, womit die Funktion von JunB als Negativregulator der c-Jun Expression zu überwiegen scheint.

Die regulatorische Funktion von JunB bei der Expression von c-Jun sollte jedoch, abhängig von der verwendeten Zelllinie, jeweils gesondert betrachtet werden, da die AP-1 Gleichgewichte der verschiedenen Zelllinien stark variieren. Unter den experimentellen Bedingungen der Stimulierung von HEK-293-p52-Zellen bzw. HEK-293-Mock-Zellen mit Hodgkin-Kulturüberstand, scheint JunB nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation der c-Jun Expression zu spielen, da die c-Jun Expression sowohl bei stark reduzierter JunB Expression (HEK-293-Mock-Zellen) als auch bei starker Expression von JunB (HEK-293-p52-Zellen) ab etwa 4 Stunden auf die Hälfte des Maximalwertes herunterreguliert wird (**Abbildung 26** und **Abbildung 28**).

Neben der Untersuchung der Expression verschiedener AP-1 Mitglieder in Abhängigkeit von der Expression von p52 wurden in gleicher Weise auch verschiedene NF- κ B Mitglieder analysiert. So beobachtet man eine erhöhte basale Expression von p105, p100 und RelB in HEK-293-p52-Zellen, wobei die Expression von RelB als einzige durch Stimulation mit Hodgkin-Kulturüberständen induziert wird. In HEK-293-Mock-Zellen kann keine basale Expression von RelB nachgewiesen werden, jedoch ist seine Expression schwach nach 6 und 8 Stunden und stärker nach 24 Stunden Stimulation mit Hodgkin-Kulturüberstand nachweisbar. Die erhöhte basale Expression von RelB lässt sich durch die ebenfalls erhöhte Expression von p105 und dessen Prozessierung zu p50 erklären. So beschreiben Bren und Kollegen (Bren, *et al.*, 2001) die Regulation der Transkription von RelB über zwei NF- κ B Bindestellen im *RELB* Promotor, von der eine vorrangig p50 bindet, die andere p65 aber auch RelB selbst. Auf der anderen Seite beschreiben Solan und Kollegen (Solan, *et al.*, 2002) p100 als Inhibitor von RelB indem es durch physikalische Interaktion RelB im Zytoplasma zurückhält. Damit sollte eine Beteiligung von RelB an der Regulation seiner eigenen Transkription eine eher untergeordnete Rolle spielen. Inwiefern eine direkte Beteiligung von p52 bei der Regulation der

Transkription von RelB, wie auch anderer potentieller Zielgene, tatsächlich eine Rolle spielt, wird in unserem Labor derzeit durch Frau Dr. Eva Kärgel mittels ChIP-Seq (Chromatin-Immunopräzipitation-Sequenzierung) und ChIP-kompatiblen p52 Antikörpern analysiert.

Nicht nur die Expressionsanalyse (**Abbildung 26**) der verschiedenen AP-1 Mitglieder sondern auch die Supershift Analyse im EMSA (**Abbildung 25-B**) nach Stimulation mit Hodgkin-Kulturüberständen zeigte in HEK-293-p52-Zellen ein den Hodgkinzellen vergleichbares AP-1 Aktivierungsmuster, welches durch eine verstärkte Expression von c-Jun, JunB und ATF-3 geprägt ist. Ebenfalls leicht induziert ist im EMSA auch die Expression von JunD.

5.4.2.2 NF- κ B/p52 induziert die AP-1 Aktivität in Hodgkinzellen

Die Untersuchungen zur Expression und Regulation von AP-1 in HEK-293 zeigten, dass stabil exprimiertes p52 eine Hodgkinzell-ähnliche AP-1-Expression induziert. Dies führte zu der Frage, ob ein derartiger Zusammenhang auch in Zellen des Hodgkin-Lymphoms zu bestätigen ist. Da diese Zellen durch eine starke Prozessierung von p100 zu p52 gekennzeichnet sind, sollte eine Herunterregulation von NF- κ B auch eine Herunterregulation von AP-1 zur Folge haben.

Eine *indirekte* Bestätigung dieser Vermutung lieferten die Ergebnisse, die durch eine stabile Herunterregulation von NF- κ B unter Verwendung des Superrepressors I κ B $\alpha\Delta$ N, in Hodgkinzellen gewonnen wurden. Dabei zeigte sich neben einer starken Reduzierung der NF- κ B Aktivität im EMSA auch eine Reduktion der AP-1 Aktivität (**Abbildung 28-A**). Hinsichtlich der Expression der Jun-Mitglieder der AP-1 Familie wurde nur eine Abnahme in der Expression des NF- κ B Zielgens JunB beobachtet, nicht jedoch der Proteine c-Jun und JunD (**Abbildung 28-C**). Damit zeigt sich, dass JunB bereits einen beträchtlichen Anteil an der konstitutiven AP-1 Aktivität der Hodgkinzellen im EMSA hat. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die Daten aus der stabilen Expression von p52 in HEK-293 (**Abbildung 26**), so würde man auch eine Reduktion der c-Jun Expression als Resultat einer Depletierung von NF- κ B durch I κ B $\alpha\Delta$ N erwarten. Neben einer Reduktion der Expression von p105 und RelB durch I κ B $\alpha\Delta$ N in 70Z3 Zellen (Krappmann, *et al.*, 2004) ist auch die Expression des NF- κ B Zielgens p100 in den I κ B $\alpha\Delta$ N-transformierten Hodgkinzellen reduziert, wird jedoch nicht vollständig unterbunden (Daten nicht gezeigt). Der Superrepressor verhindert durch das Zurückhalten von NF- κ B im Zytoplasma, dessen Translokation in den Zellkern und inhibiert damit die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B. Seine Funktion ist spezifisch für den klassischen NF- κ B Signalweg, zeigt jedoch insofern Auswirkungen auf den alternativen Signalweg, da die Expression von p100 ebenfalls unter der Kontrolle von NF- κ B steht. Möglicherweise genügen bereits geringe Mengen p100 um ein relativ stabiles Niveau der p52-Produktion zu gewährleisten (**Abbildung 28-B**). Auch wenn in diesem Experiment eine leichte Reduktion des p52 Signals zu beobachten ist, so können möglicherweise die vorhandenen Mengen an p52 für eine konstante c-Jun Expression ausreichen.

Die nur partielle Herunterregulierung von NF- κ B Zielgenen in den mit I κ B $\alpha\Delta$ N stabil transfizierten Hodgkinzellen resultiert möglicherweise daraus, dass NF- κ B essentiell für das Überleben der Hodgkinzellen ist. Eine vollständige Depletierung von NF- κ B führt zum Absterben der Zellen (Bargou, *et al.*, 1997; Hinz, *et*

al., 2001). Dies erklärt auch, warum keine Einzelklone von HDLM-2-I κ B $\alpha\Delta$ N angereichert werden konnten, bei denen die NF- κ B Aktivität komplett ausgeschaltet wurde. Die isolierten Einzelklone produzieren offenbar gerade soviel I κ B $\alpha\Delta$ N, dass ein Überleben der Hodgkinzellen noch möglich ist. Dies spiegelte sich auch in einer leicht verminderten Wachstumsrate von HDLM-2-I κ B $\alpha\Delta$ N, um etwa 35%, gegenüber HDLM-2-Mock wieder (Zellzählung mit Trypanblaufärbung). Eine etwas effizientere Methode zur Herunterregulation von NF- κ B zeigte Hinz, *et al.*, 2001 mit einer adenoviralen Transfektion von I κ B $\alpha\Delta$ N in Hodgkinzellen. Eine Infektionseffizienz von etwa 100% konnte dort jedoch nur in einer Zelllinie (HDLM-2) erzielt werden, während die der anderen Zelllinien bei etwa 30% bis 40% lag. Hinsichtlich der Expression verschiedener AP-1 Mitglieder zeigten Mathas, *et al.*, 2002 mit dieser transienten Methode ebenfalls eine Beeinflussung der Expression von JunB, einem direkten Zielgen von NF- κ B, während die c-Jun Expression 48 Stunden nach der Infektion nicht beeinflusst wurde. Hinsichtlich des Einflusses der Expression von NF- κ B2 (p100/p52) auf die Expression von anderen AP-1 Proteinen, außer JunB, treffen jedoch beide Publikationen keine Aussage. Sollte p52 tatsächlich einen Einfluss auf die Expression von c-Jun haben, so ist der Nachweis dieses Zusammenhanges in einem transienten Transfektions-/Infektionssystem recht schwierig, da p100 ein direktes Zielgen von NF- κ B ist, und erst nach einer kompletten Herunterregulation von p100 ein Effekt auf p52-abhängige „sekundäre“ NF- κ B Zielgene beobachtet werden kann. Zudem ist p52 recht stabil, so dass eine signifikante Depletierung erst nach 1-2 Tagen zu erwarten ist. Dem gegenüber steht das Auftreten einer massiven spontanen Apoptose 48 Stunden nach der Transfektion der Zellen mit I κ B $\alpha\Delta$ N (Hinz, *et al.*, 2001), welches eine Langzeitstudie von „sekundären“ NF- κ B Zielgenen, bei maximaler Transfektionseffizienz (100%) von I κ B $\alpha\Delta$ N, stark erschwert, da es zu einer Überschneidung von Ereignissen resultierend aus der Apoptose und der Herunterregulation von „sekundären“ NF- κ B Zielgenen kommt.

Da die Herunterregulierung von NF- κ B mittels I κ B $\alpha\Delta$ N keinen eindeutigen Hinweis auf eine Beteiligung von p52 an der Regulation verschiedener Mitglieder der AP-1 Familie lieferte, wurde p52 in einer weiteren Methode, mittels siRNA, **direkt** herunterreguliert. Auch bei diesem Experiment erwies sich die geringe Transfektionseffizienz der Hodgkinzellen mit den herkömmlichen Transfektionsmethoden als Problem. Daher fiel die Entscheidung nach einer Reihe von Optimierungen verschiedener Methoden zur Herunterregulation von p52 mittels siRNA oder shRNA auf eine Tetrazyklin induzierbare Methode, bei der der shRNA-Vektor stabil in das Genom der Empfängerzellen integriert werden kann. Hier lag der Vorteil der Induzierbarkeit der shRNA darin, dass die Wirkung der jeweiligen shRNA bis zu dem Zeitpunkt der Induktion mit Tetrazyklin unterdrückt wird. Wenn die Herunterregulation eines Zielgens der shRNA zum Absterben der Zellen führt, verliert man diese Klone im Laufe der Selektion der stabil transfizierten Zellen. Dieser Effekt bei der Selektion kann durch den Einsatz von induzierbarer shRNA unterbunden werden. Andererseits ist es auch möglich Langzeitstudien durchzuführen, da durch die stabile Integration der shRNA in das Genom eine permanente Expression derselben für die Zeit der Tetrazyklin-Induktion erfolgt. Letztlich kann durch die Selektion und Anreicherung stabil transfizierter Klone die geringe Transfektionseffizienz der Hodgkinzellen ausgeglichen werden. In Zusammenarbeit mit Kivia Pontes de Oliveira wurde ebenfalls eine

neuartige siRNA Technologie unter Verwendung synthetischer siRNAs angewendet, deren Transfer in die Zellen über einen passiven Mechanismus bei Nährstoffmangel (Nährstoffreduziertes Medium) erfolgt. Diese siRNAs zeichnen sich nicht nur durch eine sehr hohe Transfektionseffizienz bei den Hodgkinzellen aus, sondern auch durch eine erhöhte Stabilität gegenüber herkömmlichen synthetischen siRNAs. Damit war es nun auch möglich, durch eine transiente Transfektion, Effekte auf „sekundäre“ Zielgene zu untersuchen.

Durch die Verwendung von siRNAs beziehungsweise shRNA's gegen p100/p52 konnte der direkte Einfluss von p52 auf die AP-1 Aktivität der Hodgkinzellen dann bestätigt werden. Die Herunterregulierung von p52 in Hodgkinzellen zeigte tatsächlich eine Expressionsabnahme von c-Jun, als auch von JunB und ATF-3 (**Abbildung 29-B** und **D**). Durch eine zusätzliche Verwendung einer siRNA gegen p65 konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression des NF- κ B Zielgens JunB durch Komponenten des alternativen und des klassischen NF- κ B Signalweges reguliert wird, wobei die Expression von JunB offenbar stärker unter dem Einfluss von p52, als unter dem von p65 steht (**Abbildung 29-D**). Weiterhin konnte bestätigt werden, dass auch die Expression von RelB unter anderem auch durch p52 reguliert wird (**Abbildung 26** sowie **Abbildung 29-B** und **D**). Zusammen mit p52 kann auch eine Beteiligung von RelB an der Regulation der c-Jun Expression in Betracht gezogen werden, da geringe Mengen dieses Proteins ebenfalls mit dem *JUN* Promotor assoziieren (**Abbildung 16**).

Die Beteiligung von p52 an der Regulation der Expression von p105 in Hodgkinzellen konnte durch die Verwendung der stabil transfizierten shRNA's nicht nachgewiesen werden. Während die stabile Expression von p52 in HEK-293 eine erhöhte basale Expression von p105 zur Folge hatte (**Abbildung 26**), führte eine Herunterregulation von p52 in L428 nicht zu einer verminderten Expression von p105 (**Abbildung 29-B**). Möglicherweise reicht jedoch die Effizienz der Herunterregulation von p100/p52 bei der Verwendung der stabil exprimierten shRNA nicht aus, um in Hodgkinzellen einen Effekt auf die Expression von p105 zu beobachten. Vermutlich sind die noch vorhandenen Mengen an p52 ausreichend um eine stabile p105 Expression aufrecht zu erhalten. Andererseits kann eine zusätzliche Expression von p52 in einem p52-freien System (HEK-293), welches bereits eine hohe basale p105 Expression in Abhängigkeit von anderen Mitgliedern der NF- κ B Familie aufweist (Cogswell, *et al.*, 1993), auch zu einer Verschiebung des NF- κ B Gleichgewichtes und damit zu einer erhöhten p105 Expression führen. Damit würde eine partielle Herunterregulation von p52 in Hodgkinzellen kaum einen Effekt auf die p105 Expression zeigen.

Eine Bestätigung einer Rekrutierung von p52 an den *JUN* Promotor konnte durch p52-ChIP-Sequenzierungsexperimente in den Zelllinien L1236 und L428 von Frau Dr. Eva Kärgel in unserm Labor erhalten werden (**Abbildung 30**). Bei der Auswertung der verschiedenen ChIP-Sequenzierungs-Regionen wurde für die Zelllinie L428 unter anderem eine Region identifiziert, in welcher sich die wichtigen regulatorischen Elemente des *JUN* Promotors befinden (Kern Promotor vgl. **Abbildung 7**; Angel, *et al.*, 1988). Die identifizierte Region hat eine Länge von 2032 bp, beginnt an Position -659 und endet bei Position +1372, relativ zu dem Transkriptionsstartpunkt von *JUN*. Auf dem Chromosom 1, auf welchem sich das *JUN*-Gen befindet, beginnt diese Region bei 59021928 bp und endet bei 59023959 bp bezogen auf das humane Referenzgenom (Release hg18).

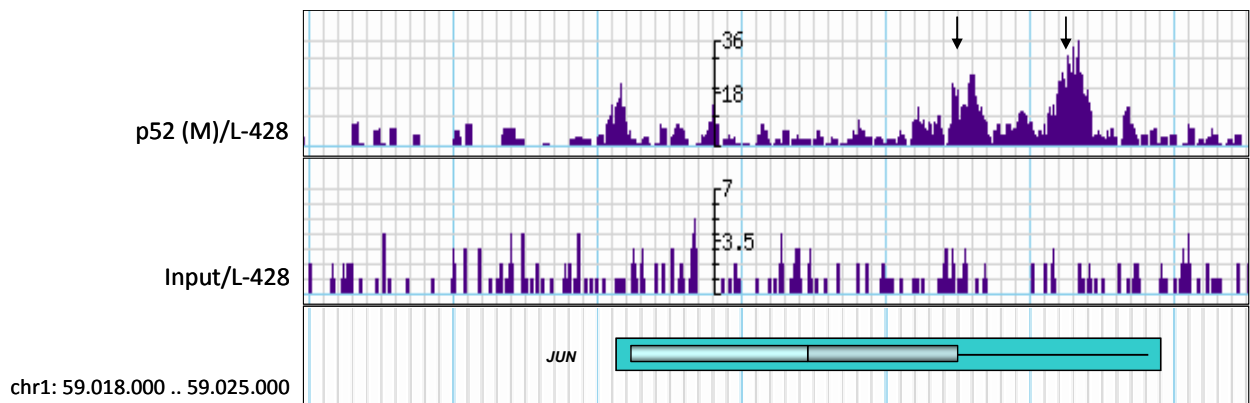
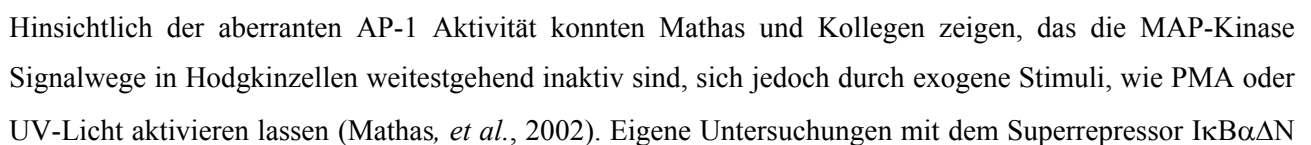


Abbildung 30: Graphische Darstellung der mittels ChIP-Sequenzierung identifizierten Regionen am *JUN* Promoter von L428:

Dargestellt ist die Sequenzabdeckung für die Regionen mit p52 Bindung (obere Graphik). Durch Pfeile gekennzeichnet sind hier zwei auffällige Cluster in der Promoter-Region von *JUN* (vgl. graphische Darstellung von *JUN*; unten), deren Intensitäten weit über dem des Inputs liegen (mitte; vgl. Y-Skale der Abdeckung). (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Eva Kärger)

Ein potientes Bindemotiv für p52, welches eine 82%-ige Ähnlichkeit zu NF- κ B Bindemotiven zeigt und sich auch im synthetischen *JUN* Promotor befindet, ist die NF-Jun Sequenz. Dieses Motiv wurde mit Hilfe der Transkriptionsfaktor-Datenbank JASPAR (<http://www.jaspar.genereg.net>) identifiziert. Die Analyse des Bindemotives von NF-Jun im EMSA zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Hodgkin und Referenzlinien (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind der NF-Jun-Sequenz benachbarte Bereiche fähig p52 direkt oder indirekt zu binden (FP-Region, SP1, CTF siehe **Abbildung 9**). So beschreiben beispielsweise Kaszubska und Kollegen (Kaszubska, *et al.*, 1993) eine physische Interaktion von c-Jun und ATF-3 am NF-ELAM1 Element (TGACATCA) des E-Selectin Promotors mit NF- κ B *in vitro* über ein benachbartes NF- κ B Element. Hinsichtlich der Basensequenz ist das NF-ELAM1 Element zu 100% identisch mit dem Jun1 Element des *JUN* Promotors.

Hodgkinzellen zeigen neben einer starken persistenten Aktivierung von NF- κ B auch eine konstitutive Aktivierung von AP-1, welche durch eine starke Überexpression von c-Jun und JunB gekennzeichnet ist. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Faktoren die mit dem *JUN* Promotor assoziiert sind, und die Untersuchung ihres Einflusses auf die c-Jun Expression. Durch verschiedene chromatographische Reinigungsschritte konnte ein weiterer Faktor der AP-1 Familie, ATF-3, sowie ein Mitglied der NF- κ B Familie, p52, identifiziert und ihr Einfluss auf die c-Jun Expression nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ist in **Abbildung 31** dargestellt.



haben ergeben, dass offenbar ein NF- κ B abhängiger Prozess die Aktivität von JNK blockiert. Die stabile Expression von I κ B $\alpha\Delta$ N in HDLM-2 zeigt eine Rekonstitution der JNK Aktivierung einhergehend mit einer anhaltenden Phosphorylierung von JNK (**Abbildung 28-D**). Trotz einer Blockierung des MAP-Kinase Signalweges zeigen Hodgkinzellen eine erhöhte Expression der c-Jun und JunB Proteine die zusammen mit JunD die Hauptkomponenten der konstitutiven AP-1 Aktivität der Hodgkinzellen sind. Während die erhöhte Expression von JunB auf die konstitutive NF- κ B Aktivität zurückzuführen ist (Mathas, *et al.*, 2002), so besteht die Besonderheit der Überexpression von c-Jun darin, dass dieses Protein seine eigene Transkription autoreguliert (Angel, *et al.*, 1988; Deng und Karin, 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein weiterer Faktor der AP-1 Familie identifiziert werden, der eine Assoziation mit dem *JUN* Promotor eingeht. Dabei handelt es sich um ATF-3, welches in Hodgkinzellen spezifisch überexprimiert wird und im Zellkern lokalisiert ist. Durch EMSA mit verschiedenen *JUN* Promotor-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass ATF-3 nicht nur an beide AP-1 Elemente des *JUN* Promotors bindet (**Abbildung 19**), sondern auch eine physikalische Interaktion mit c-Jun eingeht (**Abbildung 21**). Die Herunterregulation von ATF-3 mittels siRNA zeigte einen negativen Einfluss auf die Expression von c-Jun (**Abbildung 22**). Auf der anderen Seite enthält der Promotor des *ATF3-Gens* neben mehreren AP-1 Sequenzen auch NF- κ B Elemente, die für eine Ko-Regulation durch beide Transkriptionsfaktorfamilien sprechen (Liang, *et al.*, 1996). Sowohl durch die Überexpression von p52 in HEK-293, als auch durch die Herunterregulation von p52 in Hodgkinzellen konnte der positive Einfluss von p52 auf die ATF-3 Expression bestätigt werden (**Abbildung 26** und **Abbildung 29**). Der positive Einfluss von p52 auf die Expression von c-Jun konnte ebenfalls durch siRNA Experimente in Hodgkinzellen und durch die Überexpression von p52 in HEK-293 bestätigt werden (**Abbildung 26**, **Abbildung 27** und **Abbildung 29**). Bei der Regulation der JunB Expression scheint p52 offenbar nur teilweise eine Rolle zu spielen, da eine Überexpression von p52 keinen Einfluss auf die basale JunB Expression in HEK-293 zeigte. Erst durch Stimulation dieser stabil transfizierten Zellen mit Hodgkin Kulturüberständen erfolgte eine starke Induktion der JunB Expression (**Abbildung 26**). Eine Herunterregulation der JunB Expression konnte in Hodgkinzellen sowohl durch Inaktivierung von NF- κ B durch den Superrepressor I κ B $\alpha\Delta$ N als auch durch die Verwendung von siRNAs gegen p52 und gegen p65 beobachtet werden (**Abbildung 28** und **Abbildung 29**). Auch hinsichtlich der RelB Expression konnte ein Einfluss der p52 Expression beobachtet werden. Die Überexpression von p52 resultierte in einer Zunahme der RelB Expression in HEK-293 und die Herunterregulation von p52 in Hodgkinzellen in dessen Abnahme. Dennoch scheint der Einfluss von p52 auf die RelB Expression von untergeordneter Natur zu sein, da in den verschiedenen Hodgkinzellen trotz der starken Prozessierung von p100 zu p52 und dessen Translokation in den Kern eine sehr heterogene Expression von RelB beobachtet wurde (**Abbildung 6**). Möglicherweise spielen weitere Faktoren bei der RelB Expression eine Rolle, oder sie ist in den einzelnen Hodgkinzelllinien unterschiedlich reguliert.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die konstitutive AP-1 Aktivität der Hodgkinzellen das Resultat vieler einzelner Ereignisse in der Zelle ist. So ist die Überexpression von JunB im Wesentlichen das Ergebnis der konstitutiven NF- κ B Aktivität und wird auf molekularer Ebene unter anderem sowohl durch den klassischen Signalweg unter Beteiligung von p65, als auch den alternativen Signalweg, unter Beteiligung von p52 und

RelB, reguliert. Die Regulation von c-Jun ist komplexer als bisher angenommen. Dabei ist die Überexpression von c-Jun nicht nur durch die Autoregulation des *JUN*-Gens durch sein eigenes Genprodukt geprägt, sondern zeigt auch eine Abhängigkeit von p52 und ATF-3. Die Expression von ATF-3 wiederum wird von Komponenten der AP-1 Familie ebenso reguliert, wie auch durch die Proteine der NF- κ B Familie (Liang, *et al.*, 1996). Interessant ist, dass sich der Phänotyp der konstitutiven AP-1 Aktivität in den Hodgkinzellen unter Normalbedingungen ohne Beteiligung der MAP-Kinasekaskade zeigt, wobei diese durch einen NF- κ B abhängigen Prozess blockiert wird. Dennoch sind in diesem Zusammenhang exogene Stressfaktoren bzw. Stimuli nicht zu vernachlässigen, da diese, sobald sie einen gewissen Schwellenwert überschreiten, eine Aktivierung der MAP-Kinasekaskade zur Folge haben können.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die konstitutiv aktivierten NF- κ B- und AP-1 Signalwege in den Zellen des Hodgkin-Lymphoms in einem komplexen Netzwerk zusammenwirken. Da das Zusammenspiel von NF- κ B und AP-1 das Hodgkin-Lymphom von anderen Lymphomen mit konstitutiver NF- κ B Aktivität unterscheidet, können möglicherweise in zukünftigen Arbeiten neue pharmakologische Zielstrukturen identifiziert werden, die diese Kooperativität gezielt ausnutzen.

6 Zusammenfassung

Die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B und AP-1 Familie regulieren eine Vielzahl von Genen, die in Zelldifferenzierung, Apoptose, sowie in Entzündungsreaktionen und Immunantwort involviert sind. Eine präzise Regulation des NF- κ B Transkriptionssystems spielt *in vivo* eine entscheidende Rolle, da bereits eine geringfügige Fehlregulation starke Folgen hinsichtlich Entzündungsreaktionen und Tumorigenese haben kann. Eine persistente Aktivierung von NF- κ B führt zu einer verstärkten Expression von NF- κ B Zielgenen. Zu diesen zählen neben Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Liganden auch antiapoptotischen Gene, Zellzyklusregulatoren, Rezeptoren, Kinasen und Phosphatasen. Ferner fördert die NF- κ B-regulierte Genexpression die Zellproliferation, die Metastasierung und die Immortalisierung von Zellen, aber auch entzündungshemmende und tumorsuppressive Funktionen werden ihr zugeschrieben.

Die Zellen des Hodgkin-Lymphoms sind, neben einer permanenten Aktivierung des NF- κ B Signalweges, durch eine konstitutive AP-1 Aktivität gekennzeichnet. Während die NF- κ B Aktivierung in diesen Zellen auf eine persistente Aktivierung der in dieser Signalkaskade oberhalb gelegenen Kinasen zurückzuführen ist, wurde hinsichtlich der AP-1 Aktivität gezeigt, dass der MAP-Kinase-Signalweg, der unter anderem zur Aktivierung von AP-1 führt, inaktiv ist. Eine Besonderheit der Hodgkinzellen ist, dass trotz inaktiver MAP-Kinase-Kaskade, die Expression verschiedener Mitglieder der AP-1 Familie konstitutiv erhöht ist. Vor allem hervorzuheben sind dabei die Mitglieder JunB, dessen Expression vor allem durch NF- κ B reguliert wird, und c-Jun.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse der aberranten AP-1 Aktivität in Zellen des Hodgkin-Lymphoms. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang der *JUN* Promotor, da c-Jun unter anderem die Fähigkeit besitzt seinen eigenen Promotor positiv zu regulieren (Autoregulation).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Faktoren, die mit dem *JUN* Promotor in Zellen des Hodgkin-Lymphoms assoziiert sind, über verschiedene chromatographische Reinigungsschritte angereichert, mittels Massenspektrometrie identifiziert und hinsichtlich ihres Einflusses auf die c-Jun Expression analysiert. Dabei wurden die zwei Faktoren ATF-3, aus der Familie der AP-1 Proteine, und p52, aus der NF- κ B Familie, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Überexpression von c-Jun in Hodgkinzellen genauer untersucht. Für ATF-3 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in Zellen des Hodgkin-Lymphoms stark überexprimiert wird und im Zellkern lokalisiert ist. Hinsichtlich der Regulation der c-Jun Expression stellte sich heraus, dass ATF-3 nicht nur mit den beiden AP-1 Bindestellen im *JUN* Promotor interagiert, sondern auch eine physische Interaktion mit c-Jun selbst eingeht. Die Herunterregulation von ATF-3 mittels spezifischer siRNAs resultierte in einer Abnahme der c-Jun Expression in Hodgkinzellen.

Der zweite Faktor, der eine Interaktion mit dem *JUN* Promotor zeigte, ist p52. Die konstitutive NF- κ B Aktivität der Hodgkinzellen ist unter anderem durch eine permanente verstärkte Prozessierung von p100 zu p52 gekennzeichnet. Der Einfluss von p52 auf die Expression von Mitgliedern der AP-1 Familie wurde dabei über zwei unterschiedliche Herangehensweisen gezeigt. So konnte einerseits durch die stabile Expression

von p52 in einem p52-defizienten System in HEK-293, eine basal erhöhte Expression von c-Jun und ATF-3 beobachtet werden, andererseits eine Stimulus-abhängige Expression von JunB und c-Jun. Eine Bestätigung dieser Befunde erfolgte in Hodgkinzellen unter Verwendung spezifischer siRNAs. Eine Herunterregulation von p52 resultierte unter anderem in einer Abnahme der Expression von c-Jun, JunB und ATF-3. Durch die Herunterregulierung von p65 konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von JunB nicht ausschließlich p52-abhängig ist. Durch die Verwendung des Superrepressors I κ B α Δ N konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Blockierung des MAP-Kinase-Signalweges durch einen NF- κ B-abhängigen Prozess erfolgt. Eine Inaktivierung von NF- κ B zeigte dabei eine permanente Phosphorylierung von JNK in den Hodgkinzellen.

Zusammengefasst tragen die hier aufgeführten Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der Regulation der konstitutiven AP-1 Aktivität in den Hodgkinzellen bei. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei weitere Faktoren identifiziert werden, die maßgeblich an der Regulation der Expression von c-Jun in Hodgkinzellen beteiligt sind. Eine besondere Rolle kommt dabei dem Transkriptionsfaktor p52 zu, da dieser unter anderem auch die Expression anderer Mitglieder der AP-1 Familie reguliert. Ein weiterer Befund dieser Arbeit, dass p50 und p52 die zentralen Komponenten der konstitutiven NF- κ B Aktivität sind, rückt p52 in das Zentrum zukünftiger Forschung. Die Befunde dieser Arbeit belegen auch, dass die aberrante Aktivierung von AP-1 im Hodgkin-Lymphom nicht auf ein einzelnes Ereignis in der Zelle zurückzuführen ist, sondern das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels vieler Faktoren ist.

7 Abkürzungen

A	Adenosin
A. bid.	Aqua bidest
Abb.	Abbildung
abs	absolut
A.d.	Aqua dest.
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
cpm	Counts per Minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendimintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMSA	Electromobility Shiftassay
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calf Serum
G	Guanosin
h	Stunde
HBS	HEPES Buffered Saline (HEPES gepufferte Kochsalzlösung)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor von NF-Kappa-B
IKK	I κ B Kinase (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunits alpha, beta, gamma)
IL	Interleukin

IL-R	IL-Rezeptor
IP	Immunopräzipitation
JNK	Jun N-terminal Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth
LPS	Lipopolysaccharid
Min.	Minute
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NLS	nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal)
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
ss	einzelsträngig
ss	Supershift
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll Like Receptor
TNF α	tumor necrosis factor alpha (Tumor Nekrose Faktor α)
TNFR	TNF Rezeptor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate
TRAF	TNF-Rezeptor Associated Factor
TRE	TPA-Response-Element
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit

Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Strahlung
WT	Wildtyp

8 Erklärung

Ich versichere hiermit, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt wurde und ich die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Diese Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegt. Ich versichere ebenfalls, dass ich mich weder anderwärtig um einen Doktorgrad beworben habe, noch einen entsprechenden Doktorgrad besitze.

Teile dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Kivia Aparecida Pontes de Oliveira durchgeführt. Diese Arbeiten betrafen die gemeinsame Herstellung der Tetrazyklin-Repressor exprimierenden stabilen Hodgkinlinien, sowie der stabilen induzierbaren shRNA Klone. Das Ziel ihrer Arbeit ist eine umfassende Zielgenanalyse von NF- κ B mit der Differenzierung in Zielgene des klassischen und des alternativen Signalweges in Hodgkinzellen.

Berlin, den

9 Danksagung

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Experimente wurden am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Claus Scheidereit für meine Aufnahme als Doktorand in seine Arbeitsgruppe am MDC, sein stetes Interesse am Fortgang der Forschungsarbeiten und die kritische Durchsicht bei der Abfassung der vorliegenden Schrift, sowie für die problemlose Finanzierung der Promotionszeit.

Prof. Dr. Wolfgang Lockau danke ich für die Bereitschaft, als mein Betreuer an der Humboldt-Universität zu fungieren.

Von herausragender Bedeutung für das Gelingen dieser Doktorarbeit war der Arbeitseinsatz von Frau Dr. Eva Kärgel, von deren langjähriger Erfahrung ich sehr profitiert habe. Darüber hinaus waren die vielen kritischen Diskussionen hilfreich für mich und nicht zuletzt habe ich in ihr einen vertrauenswürdigen Partner bei der täglichen Arbeit gefunden.

Weiterhin danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen am MDC für die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt dabei Kivia Aparecida Pontes de Oliveira, die mir nicht nur eine große Unterstützung bei unserer Zusammenarbeit mit den siRNAs war, sondern auch durch ihren Einsatz und die steten konstruktiven Diskussionen zusammen mit Dr. Michael Stilmann und Dr. Zekiye Buket Yilmaz maßgeblichen Anteil an dem Abschluss der Arbeit hatten. Ebenfalls danke ich Dr. Albrecht Otto und Dr. Eva-Christina Müller für die praktische Unterstützung bei der Massenspektrometrie.

Besonderen Dank schulde ich meiner Frau Inna und meiner Familie, die mich während der gesamten Arbeitsdauer begleiteten und mich auf vielerlei Weise unterstützten.

10 Abbildungsliste und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1:	Schematische allgemeine Darstellung der Signaltransduktion in einer Zelle durch extrazelluläre Stimuli:	1
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Strukturen einiger wichtiger NF- κ B- und I κ B-Proteine:	5
Abbildung 3:	Der klassische und der alternative NF- κ B Signalweg:	10
Abbildung 4:	Die wichtigsten MAP-Kinase Kaskaden in Zellen der Säugetiere:	12
Abbildung 5:	Die schematische Darstellung der Struktur von c-Jun:	17
Abbildung 6:	Kern-Zytoplasma-Fraktionierung verschiedener Lysate von Hodgkinzelllinien (blau) und Vergleichszelllinien (rot):	57
Abbildung 7:	Erhöhte Transkriptionsaktivität am <i>JUN</i> Promotor in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien:	59
Abbildung 8:	Erhöhte Expression von GATA3 in Zellen des Hodgkin Lymphoms:	61
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des <i>JUN</i> Promotors (<i>oben</i>) mit seinen bekannten Transkriptionsfaktorbindestellen:	62
Abbildung 10:	Vergleich der Kernextrakte verschiedener Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen (blau) und verschiedener Vergleichszellen im EMSA mit dem synthetischen <i>JUN</i> Promotor Fragment „JunPro78“:	63
Abbildung 11:	Darstellung des dialysierten DE-52-Pools aus L428 und Namalwa nach Auftrennung an SP-Sephrose im EMSA:	64
Abbildung 12:	Darstellung des dialysierten SP-Sephrose-Pools aus L428 und Namalwa nach Auftrennung an Heparin-Sephrose im EMSA:	65
Abbildung 13:	Darstellung des dialysierten Heparin-Sephrose-Pools aus L428 und Namalwa nach Auftrennung an doppelsträngiger DNA-Cellulose:	66
Abbildung 14:	Darstellung des dialysierten DNA-Cellulose-Pools aus L428 und Namalwa nach Auftrennung an doppelsträngiger JunPro78-Sephrose im EMSA:	67
Abbildung 15:	Auftrennung der gereinigten Pools mittels Gelelektrophorese für die LC-MS/MS Analyse:	68
Abbildung 16:	Analyse einiger ausgewählter Proteine des gereinigten JunPro78-Sephrose-Pools im Westernblot:	72
Abbildung 17:	Analyse der Bindspezifität des gereinigten JunPro78-Sephrose-Pools im EMSA:	73
Abbildung 18:	Analyse der Zusammensetzung des am synthetischen <i>JUN</i> Promotor „JunPro78“ gereinigten Fraktion:	74
Abbildung 19:	ATF-3 wird in Zellen des Hodgkin Lymphoms überexprimiert:	76
Abbildung 20:	ATF-3 ist in Zellen des Hodgkin Lymphoms ausschließlich im Kern lokalisiert:	77
Abbildung 21:	Physikalische Wechselwirkung zwischen c-Jun und ATF-3 in Lysaten von Hodgkinzellen:	79
Abbildung 22:	Die Herunterregulation von ATF-3 mittels siRNA und ihre Auswirkung auf die AP-1 Expression:	80
Abbildung 23:	Wirkung von Kulturüberständen verschiedener Hodgkinzelllinien auf HEK-293 Zellen:	82
Abbildung 24:	Neutralisierung von TNF- β im Überstand von L428 und der Effekt auf die induzierbare NF- κ B und AP-1 Aktivität in HEK-293 durch Hodgkin-Kulturüberstände:	85
Abbildung 25:	Stabile Expression von p52 in HEK-293 Zellen:	89
Abbildung 26:	Analyse der Expression von NF- κ B und AP-1 Proteinen in HEK-293-p52-Zellen nach Stimulation mit KMH-2 Überständen:	89
Abbildung 27:	Auswirkung der stabilen ektopischen Expression von p52 in HEK-293 Zellen auf die Aktivität des <i>JUN</i> Promotors nach Stimulation mit dem Kulturüberstand der Hodgkinzelllinie KMH-2:	90
Abbildung 28:	Auswirkung der stabilen ektopischen Expression von I κ B α ΔN in HDLM-2 Zellen:	93
Abbildung 29:	Auswirkung der Herunterregulation von p52 mittels shRNA in L428-T-REx Zellen:	96
Abbildung 30:	Graphische Darstellung der mittels ChIP-Sequenzierung identifizierten Regionen am <i>JUN</i> Promoter von L428:	115
Abbildung 31:	Regulation der AP-1 Aktivität durch die konstitutive NF- κ B Aktivität:	116

Tabellen:

Tabelle 1: Ausgewählte Ergebnisse der Analyse mittels LC-MS/MS:	69
Tabelle 2: Einige exokrine Faktoren, deren Expression in Abhängigkeit von NF- κ B erfolgt:	81
Tabelle 3: Analyse von Kulturüberständen von Hodgkin- (blau) und Referenzzelllinien (rot):	83

11 Literatur

- 1 Adunyah, S. E., Unlap, T. M., Wagner, F. & Kraft, A. S. Regulation of c-jun expression and AP-1 enhancer activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* **266**, 5670-5675, (1991).
- 2 Agarwal, S. K. *et al.* Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* **96**, 143-152, (1999).
- 3 Ahmed, K. M., Cao, N. & Li, J. J. HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer. *Anticancer Res* **26**, 4235-4243, (2006).
- 4 Aldinucci, D. *et al.* Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int J Cancer* **122**, 769-776, (2008).
- 5 Ambinder, R. F. Epstein-barr virus and hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 204-209, (2007).
- 6 Angel, P. *et al.* Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* **332**, 166-171, (1988).
- 7 Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. & Karin, M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**, 875-885, (1988).
- 8 Angel, P. *et al.* Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**, 729-739, (1987).
- 9 Angiolillo, A. L. *et al.* Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* **182**, 155-162, (1995).
- 10 Aranha, M. M. *et al.* NF-kappaB and apoptosis in colorectal tumorigenesis. *Eur J Clin Invest* **37**, 416-424, (2007).
- 11 Azimi, N. *et al.* Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2452-2457, (1998).
- 12 Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**, 540-546, (1988).
- 13 Baeuerle, P. A. & Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**, 141-179, (1994).
- 14 Bargou, R. C. *et al.* Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* **100**, 2961-2969, (1997).
- 15 Bargou, R. C. *et al.* High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **87**, 4340-4347, (1996).
- 16 Beinke, S. & Ley, S. C. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* **382**, 393-409, (2004).

- 17 Ben-Neriah, Y. & Karin, M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol* **12**, 715-723, (2011).
- 18 Benbrook, D. M. & Jones, N. C. Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* **5**, 295-302, (1990).
- 19 Best, J. L. *et al.* SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol Cell* **10**, 843-855, (2002).
- 20 Bitko, V., Velazquez, A., Yang, L., Yang, Y. C. & Barik, S. Transcriptional induction of multiple cytokines by human respiratory syncytial virus requires activation of NF-kappa B and is inhibited by sodium salicylate and aspirin. *Virology* **232**, 369-378, (1997).
- 21 Bodmer, J.-L., Schneider, P. & Tschopp, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* **27**, 19-26, (2002).
- 22 Bohmann, D. *et al.* Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238**, 1386-1392, (1987).
- 23 Bonizzi, G. & Karin, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**, 280-288, (2004).
- 24 Borsch-Haubold, A. G. *et al.* Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J Biol Chem* **273**, 4449-4458, (1998).
- 25 Borsch-Haubold, A. G. *et al.* Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways. *Eur J Biochem* **265**, 195-203, (1999).
- 26 Boyle, W. J. *et al.* Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* **64**, 573-584, (1991).
- 27 Brauninger, A. *et al.* Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Cancer* **118**, 1853-1861, (2006).
- 28 Breitwieser, W. *et al.* Feedback regulation of p38 activity via ATF2 is essential for survival of embryonic liver cells. *Genes Dev* **21**, 2069-2082, (2007).
- 29 Bren, G. D. *et al.* Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB. *Oncogene* **20**, 7722-7733, (2001).
- 30 Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. & Karin, M. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* **337**, 661-663, (1989).
- 31 Broemer, M., Krappmann, D. & Scheidereit, C. Requirement of Hsp90 activity for I kappa B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF-kappa B activation. *Oncogene* **23**, 5378-5386, (2004).
- 32 Brown, R. T., Ades, I. Z. & Nordan, R. P. An acute phase response factor/NF-kappa B site downstream of the junB gene that mediates responsiveness to interleukin-6 in a murine plasmacytoma. *J Biol Chem* **270**, 31129-31135, (1995).
- 33 Bubici, C., Papa, S., Pham, C. G., Zazzeroni, F. & Franzoso, G. NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle* **3**, 1524-1529, (2004).

- 34 Bunting, K. *et al.* Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF-kappa B transcription factor c-Rel. *J Immunol* **178**, 7097-7109, (2007).
- 35 Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R. F. & Hay, R. T. Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha. *Oncogene* **18**, 3063-3070, (1999).
- 36 Calderhead, D. M., Kosaka, Y., Manning, E. M. & Noelle, R. J. CD40-CD154 interactions in B-cell signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* **245**, 73-99, (2000).
- 37 Carey, M. F., Peterson, C. L. & Smale, S. T. Dignam and Roeder Nuclear Extract Preparation. *Cold Spring Harb Protoc* **2009**, pdb.prot5330-, (2009).
- 38 Cattaruzza, L. *et al.* Functional coexpression of Interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: Involvement of IL-7 in tumor cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* **125**, 1092-1101, (2009).
- 39 Cavellan, E., Asp, P., Percipalle, P. & Farrants, A. K. The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription. *J Biol Chem* **281**, 16264-16271, (2006).
- 40 Chandrasekar, B., Mitchell, D. H., Colston, J. T. & Freeman, G. L. Regulation of CCAAT/Enhancer binding protein, interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp130 expression during myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **99**, 427-433, (1999).
- 41 Chang, L. *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase Itch Couples JNK Activation to TNF[alpha]-induced Cell Death by Inducing c-FLIPL Turnover. *Cell* **124**, 601-613, (2006).
- 42 Chang, Y. H., Hsieh, S. L., Chen, M. C. & Lin, W. W. Lymphotoxin beta receptor induces interleukin 8 gene expression via NF-kappaB and AP-1 activation. *Exp Cell Res* **278**, 166-174, (2002).
- 43 Chatton, B. *et al.* Jun and Fos heterodimerize with ATFa, a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene* **9**, 375-385, (1994).
- 44 Chen, B. P., Liang, G., Whelan, J. & Hai, T. ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* **269**, 15819-15826, (1994).
- 45 Chen, G., Cao, P. & Goeddel, D. V. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* **9**, 401-410., (2002).
- 46 Chen, L., Glover, J. N., Hogan, P. G., Rao, A. & Harrison, S. C. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* **392**, 42-48, (1998).
- 47 Chen, L. F. & Greene, W. C. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 392-401, (2004).
- 48 Cheng, J., Perkins, N. D. & Yeh, E. T. Differential regulation of c-Jun-dependent transcription by SUMO-specific proteases. *J Biol Chem* **280**, 14492-14498, (2005).
- 49 Chiao, P. J., Miyamoto, S. & Verma, I. M. Autoregulation of I kappa B alpha activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 28-32, (1994).

- 50 Chida, K. & Vogt, P. K. Nuclear translocation of viral Jun but not of cellular Jun is cell cycle dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4290-4294, (1992).
- 51 Chiu, R., Angel, P. & Karin, M. Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* **59**, 979-986, (1989).
- 52 Chiu, R. *et al.* The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**, 541-552, (1988).
- 53 Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H. & Siebenlist, U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* **3**, 958-965, (2002).
- 54 Clodi, K. *et al.* Expression of CD40 ligand (CD154) in B and T lymphocytes of Hodgkin disease. *Cancer* **94**, 1-5, (2002).
- 55 Cogswell, P. C., Scheinman, R. I. & Baldwin, A. S., Jr. Promoter of the human NF-kappa B p50/p105 gene. Regulation by NF-kappa B subunits and by c-REL. *J Immunol* **150**, 2794-2804, (1993).
- 56 Cohen, L., Henzel, W. J. & Baeuerle, P. A. IKAP is a scaffold protein of the IkappaB kinase complex. *Nature* **395**, 292-296., (1998).
- 57 Collart, M. A., Baeuerle, P. & Vassalli, P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **10**, 1498-1506, (1990).
- 58 Coope, H. J. *et al.* CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* **21**, 5375-5385, (2002).
- 59 Cortesy, B. & Kao, P. N. Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter. *J Biol Chem* **269**, 20682-20690, (1994).
- 60 Dalton, S. & Treisman, R. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* **68**, 597-612, (1992).
- 61 Daugherty, B. L. *et al.* Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med* **183**, 2349-2354, (1996).
- 62 Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252, (2000).
- 63 de Martin, R. *et al.* Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I kappa B alpha-like gene is regulated by NF kappa B. *EMBO J* **12**, 2773-2779, (1993).
- 64 De Smaele, E. *et al.* Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* **414**, 308-313, (2001).
- 65 Deng, T. & Karin, M. Construction and expression of a monomeric c-Jun protein that binds and activates transcription of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8572-8576, (1992).
- 66 Derijard, B. *et al.* JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025-1037, (1994).
- 67 Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. & Hay, R. T. SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* **2**, 233-239, (1998).

- 68 DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E. & Karin, M. A cytokine-responsive I[κ]B kinase that activates the transcription factor NF-[κ]B. *Nature* **388**, 548-554, (1997).
- 69 DiDonato, J. A., Mercurio, F. & Karin, M. NF-[κ]B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev* **246**, 379-400, (2012).
- 70 Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research* **11**, 1475-1489, (1983).
- 71 Ducut Sigala, J. L. *et al.* Activation of transcription factor NF-[κ]B requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. *Science* **304**, 1963-1967, (2004).
- 72 Dufour, J. H. *et al.* IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* **168**, 3195-3204, (2002).
- 73 Dutton, A., Reynolds, G. M., Dawson, C. W., Young, L. S. & Murray, P. G. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol* **205**, 498-506, (2005).
- 74 Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498, (2001-b).
- 75 Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200, (2001-a).
- 76 Emmerich, F. *et al.* Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-[κ]B activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* **94**, 3129-3134, (1999).
- 77 Fichtner-Feigl, S. *et al.* Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. *J Immunol* **178**, 5859-5870, (2007).
- 78 Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K. & Kitani, A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* **12**, 99-106, (2006).
- 79 Fire, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* **15**, 358-363, (1999).
- 80 Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811, (1998).
- 81 Foss, H. D. *et al.* Lymphotoxin, tumour necrosis factor and interleukin-6 gene transcripts are present in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of most Hodgkin's disease cases. *Br J Haematol* **84**, 627-635, (1993).
- 82 Freundlieb, S., Schirra-Muller, C. & Bujard, H. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med* **1**, 4-12, (1999).
- 83 Fuchs, S. Y., Dolan, L., Davis, R. J. & Ronai, Z. Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* **13**, 1531-1535, (1996).
- 84 Gamble, M. J. & Fisher, R. P. SET and PARP1 remove DEK from chromatin to permit access by the transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 548-555, (2007).

- 85 Garaude, J. *et al.* SUMOylation regulates the transcriptional activity of JunB in T lymphocytes. *J Immunol* **180**, 5983-5990, (2008).
- 86 Gardam, S., Sierro, F., Basten, A., Mackay, F. & Brink, R. TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity* **28**, 391-401, (2008).
- 87 Gartel, A. L. Mechanisms of apoptosis induced by anticancer compounds in melanoma cells. *Curr Top Med Chem* **12**, 50-52, (2012).
- 88 Gentz, R., Rauscher, F. J., 3rd, Abate, C. & Curran, T. Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science* **243**, 1695-1699, (1989).
- 89 Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225-260., (1998).
- 90 Goh, K. C., Haque, S. J. & Williams, B. R. p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *EMBO J* **18**, 5601-5608, (1999).
- 91 Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-5551, (1992).
- 92 Graham, F. L. & van der Eb, A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467, (1973).
- 93 Grove, M. & Plumb, M. C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. *Mol Cell Biol* **13**, 5276-5289, (1993).
- 94 Guan, D. *et al.* Nuclear factor 45 (NF45) is a regulatory subunit of complexes with NF90/110 involved in mitotic control. *Mol Cell Biol* **28**, 4629-4641, (2008).
- 95 Guo, Y. L., Baysal, K., Kang, B., Yang, L. J. & Williamson, J. R. Correlation between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. *J Biol Chem* **273**, 4027-4034, (1998).
- 96 Gupta, S. *et al.* Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* **15**, 2760-2770, (1996).
- 97 Hai, T. & Curran, T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3720-3724, (1991).
- 98 Hai, T. & Hartman, M. G. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273**, 1-11, (2001).
- 99 Hardy, C. L. *et al.* Interleukin-13 regulates secretion of the tumor growth factor- β superfamily cytokine activin A in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 667-675, (2010).
- 100 Hashimoto, Y. *et al.* An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Res* **30**, 2398-2406, (2002).

- 101 Hattori, K., Angel, P., Le Beau, M. M. & Karin, M. Structure and chromosomal localization of the functional intronless human JUN protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9148-9152, (1988).
- 102 Hayakawa, J. *et al.* Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Mol Cell* **16**, 521-535, (2004).
- 103 Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF- κ B. *Genes & Development* **18**, 2195-2224, (2004).
- 104 Hazzalin, C. A. & Mahadevan, L. C. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 30-40, (2002).
- 105 Hein, H. *et al.* Genomic organization, sequence, and transcriptional regulation of the human eotaxin gene. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 537-542, (1997).
- 106 Herbst, H. *et al.* Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. *Ann Oncol* **3 Suppl 4**, 27-30, (1992).
- 107 Herr, I., van Dam, H. & Angel, P. Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the c-jun promoter by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis* **15**, 1105-1113, (1994).
- 108 Herskowitz, I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**, 187-197, (1995).
- 109 Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. & Karin, M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* **7**, 2135-2148, (1993).
- 110 Hibi, M. *et al.* Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**, 1149-1157, (1990).
- 111 Hinz, M., Arslan, S. Ç. & Scheidereit, C. It takes two to tango: I κ Bs, the multifunctional partners of NF- κ B. *Immunol. Rev.* **246**, 59-76, (2012).
- 112 Hinz, M. *et al.* Signal responsiveness of I κ B kinases is determined by Cdc37-assisted transient interaction with Hsp90. *J Biol Chem* **282**, 32311-32319, (2007).
- 113 Hinz, M. *et al.* Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med* **196**, 605-617, (2002).
- 114 Hinz, M. *et al.* Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **97**, 2798-2807, (2001).
- 115 Hinz, M. & Scheidereit, C. The I κ B kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond. *EMBO Rep* **15**, 46-61, (2014).
- 116 Hirai, S. I., Ryseck, R. P., Mechta, F., Bravo, R. & Yaniv, M. Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *Embo J* **8**, 1433-1439, (1989).
- 117 Hiscott, J. *et al.* Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* **13**, 6231-6240, (1993).
- 118 Hodgkin, T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans* **17**, 68-114, (1832).

- 119 Hollenbach, A. D., McPherson, C. J., Mientjes, E. J., Iyengar, R. & Grosveld, G. Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* **115**, 3319-3330, (2002).
- 120 Holmstrom, T. H. *et al.* c-Jun supports ribosomal RNA processing and nucleolar localization of RNA helicase DDX21. *J Biol Chem* **283**, 7046-7053, (2008).
- 121 Horie, R., Watanabe, T. & Umezawa, K. Blocking NF-kappaB as a potential strategy to treat adult T-cell leukemia/lymphoma. *Drug News Perspect* **19**, 201-209, (2006).
- 122 Hoyos, B., Ballard, D. W., Bohnlein, E., Siekevitz, M. & Greene, W. C. Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* **244**, 457-460, (1989).
- 123 Hsu, P. L. & Hsu, S. M. Production of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin by cells of Hodgkin's neoplastic cell lines HDLM-1 and KM-H2. *Am J Pathol* **135**, 735-745, (1989).
- 124 Ichijo, H. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**, 6087-6093, (1999).
- 125 Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28, (1990).
- 126 Ip, Y. T. & Davis, R. J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 205-219, (1998).
- 127 Ivashkiv, L. B. *et al.* mXBP/CRE-BP2 and c-Jun form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, response element. *Mol Cell Biol* **10**, 1609-1621, (1990).
- 128 Jain, J. *et al.* The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* **365**, 352-355, (1993).
- 129 Janz, M. *et al.* Classical Hodgkin lymphoma is characterized by high constitutive expression of activating transcription factor 3 (ATF3), which promotes viability of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **107**, 2536-2539, (2006).
- 130 Jundt, F. *et al.* Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia* **22**, 1587-1594, (2008).
- 131 Jundt, F. *et al.* Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **99**, 3398-3403, (2002).
- 132 Jundt, F. *et al.* Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood* **103**, 3511-3515, (2004).
- 133 Jungnickel, B. *et al.* Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med* **191**, 395-402, (2000).
- 134 Kageyama, R., Sasai, Y. & Nakanishi, S. Molecular characterization of transcription factors that bind to the cAMP responsive region of the substance P precursor gene. cDNA cloning of a novel C/EBP-related factor. *J Biol Chem* **266**, 15525-15531, (1991).
- 135 Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M. & Karin, M. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* **87**, 929-939, (1996).

- 136 Kang, S. S. *et al.* Human placenta promotes IL-8 expression through activation of JNK/SAPK and transcription factors NF-kappaB and AP-1 in PMA-differentiated THP-1 cells. *Int Immunopharmacol* **7**, 1488-1495, (2007).
- 137 Kao, P. N. *et al.* Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90. *J Biol Chem* **269**, 20691-20699, (1994).
- 138 Karin, M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* **18**, 6867-6874, (1999).
- 139 Karin, M. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog* **45**, 355-361, (2006).
- 140 Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431-436, (2006).
- 141 Karin, M. & Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221-227, (2002).
- 142 Kashkar, H. *et al.* XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med* **198**, 341-347, (2003).
- 143 Kaszubska, W. *et al.* Cyclic AMP-independent ATF family members interact with NF-kappa B and function in the activation of the E-selectin promoter in response to cytokines. *Mol Cell Biol* **13**, 7180-7190, (1993).
- 144 Kato, Y. *et al.* Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**, 713-716, (1998).
- 145 Kawakami, K., Scheidereit, C. & Roeder, R. G. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4700-4704, (1988).
- 146 Kerppola, T. K. & Curran, T. Maf and Nrl can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun. *Oncogene* **9**, 675-684, (1994).
- 147 Kim, E. K. & Choi, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 396-405, (2010).
- 148 Kim, L. J., Ferguson, H. A., Seto, A. G. & Goodrich, J. A. Characterization of DNA binding, transcriptional activation, and regulated nuclear association of recombinant human NFATp. *BMC Immunol* **1**, 1, (2000).
- 149 Klevernic, I. V., Martin, N. M. & Cohen, P. Regulation of the activity and expression of ERK8 by DNA damage. *FEBS Lett* **583**, 680-684, (2009).
- 150 Knecht, H., Berger, C., Rothenberger, S., Odermatt, B. F. & Brousset, P. The role of Epstein-Barr virus in neoplastic transformation. *Oncology* **60**, 289-302, (2001).
- 151 Kortmann, C. *et al.* Interleukin-1-like activity constitutively generated by Hodgkin derived cell lines. I. Measurement in a human lymphocyte co-stimulator assay. *Immunobiology* **166**, 318-333, (1984).
- 152 Kramer, R. M. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem* **271**, 27723-27729, (1996).

- 153 Krappmann, D. *et al.* Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* **18**, 943-953, (1999).
- 154 Krappmann, D. *et al.* The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component. *J Biol Chem* **275**, 29779-29787, (2000).
- 155 Krappmann, D. *et al.* The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol Cell Biol* **24**, 6488-6500, (2004).
- 156 Krensky, A. M. & Ahn, Y. T. Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol* **3**, 164-170, (2007).
- 157 Kunsch, C., Lang, R. K., Rosen, C. A. & Shannon, M. F. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* **153**, 153-164, (1994).
- 158 Kunsch, C. & Rosen, C. A. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* **13**, 6137-6146, (1993).
- 159 Kuppers, R., Engert, A. & Hansmann, M. L. Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* **122**, 3439-3447, (2012).
- 160 Küppers, R. *et al.* Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest* **111**, 529-537, (2003).
- 161 Kuppers, R. & Rajewsky, K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* **16**, 471-493, (1998).
- 162 Küppers, R. & Rajewsky, K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* **16**, 471-493, (1998).
- 163 Kuprash, D. V. *et al.* Functional analysis of the lymphotoxin-beta promoter. Sequence requirements for PMA activation. *J Immunol* **156**, 2465-2472, (1996).
- 164 Kyriakis, J. M. *et al.* Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417-421, (1992).
- 165 Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* **271**, 24313-24316, (1996).
- 166 Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, (1970).
- 167 Lai, J. H. *et al.* RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter. *Mol Cell Biol* **15**, 4260-4271, (1995).
- 168 Lamb, J. A., Ventura, J. J., Hess, P., Flavell, R. A. & Davis, R. J. JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell* **11**, 1479-1489, (2003).
- 169 Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. & Verma, I. M. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* **334**, 629-631, (1988).
- 170 Landschulz, W. H., Johnson, P. F. & McKnight, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764, (1988).

- 171 Le Bail, O., Schmidt-Ullrich, R. & Israel, A. Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. *Embo J* **12**, 5043-5049., (1993).
- 172 Lee, I. S., Shin, Y. K., Chung, D. H. & Park, S. H. LMP1-induced downregulation of CD99 molecules in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leuk Lymphoma* **42**, 587-594, (2001).
- 173 Leppä, S., Saffrich, R., Ansorge, W. & Bohmann, D. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J* **17**, 4404-4413, (1998).
- 174 Lewis, J. *et al.* Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* **275**, 10519-10526., (2000).
- 175 Li, B., Tournier, C., Davis, R. J. & Flavell, R. A. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J* **18**, 420-432, (1999).
- 176 Li, X. Y. & Green, M. R. Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes Dev* **10**, 517-527, (1996).
- 177 Liang, G., Wolfgang, C. D., Chen, B. P., Chen, T. H. & Hai, T. ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *J Biol Chem* **271**, 1695-1701, (1996).
- 178 Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E. W. & Sun, S. C. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* **279**, 26243-26250, (2004).
- 179 Liberati, N. T. *et al.* Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4844-4849, (1999).
- 180 Libermann, T. A. & Baltimore, D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* **10**, 2327-2334, (1990).
- 181 Lind, D. S. *et al.* Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* **130**, 363-369, (2001).
- 182 Liu, S. *et al.* Crystal structure of a human IkappaB kinase beta asymmetric dimer. *J Biol Chem* **288**, 22758-22767, (2013).
- 183 Lopez-Bergami, P., Lau, E. & Ronai, Z. Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 65-76, (2010).
- 184 Lu, L., Chen, S. S., Zhang, J. Q., Ramires, F. J. & Sun, Y. Activation of nuclear factor-kappaB and its proinflammatory mediator cascade in the infarcted rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 879-885, (2004).
- 185 Luster, A. D., Unkeless, J. C. & Ravetch, J. V. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* **315**, 672-676, (1985).
- 186 Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. & Vogt, P. K. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2848-2852, (1987).

- 187 Marfaing-Koka, A. *et al.* Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J Immunol* **154**, 1870-1878, (1995).
- 188 Marienfeld, R. *et al.* RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem* **278**, 19852-19860, (2003).
- 189 Marshall, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-185, (1995).
- 190 Masutani, H. *et al.* Activation of the c-fos SRE through SAP-1a. *Oncogene* **15**, 1661-1669, (1997).
- 191 Mathas, S. *et al.* Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J* **21**, 4104-4113, (2002).
- 192 Mathas, S. *et al.* c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **199**, 1041-1052, (2004).
- 193 McKenzie, J. L., Egner, W., Calder, V. L. & Hart, D. N. Hodgkin's disease cell lines: a model for interleukin-1-independent accessory cell function. *Immunology* **77**, 345-353, (1992).
- 194 Meixner, A., Karreth, F., Kenner, L. & Wagner, E. F. JunD regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression. *EMBO J* **23**, 1325-1335, (2004).
- 195 Melamed, D. *et al.* Interleukin 6 induces DNA binding activity of AP1 in M1 myeloblastic cells but not in a growth resistant cell derivative. *Cell Growth Differ* **4**, 689-697, (1993).
- 196 Mellits, K. H., Hay, R. T. & Goodbourn, S. Proteolytic degradation of MAD3 (I kappa B alpha) and enhanced processing of the NF-kappa B precursor p105 are obligatory steps in the activation of NF-kappa B. *Nucleic Acids Res* **21**, 5059-5066, (1993).
- 197 Mercurio, F. *et al.* IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **278**, 860-866., (1997).
- 198 Messer, G., Weiss, E. H. & Baeuerle, P. A. Tumor necrosis factor beta (TNF-beta) induces binding of the NF-kappa B transcription factor to a high-affinity kappa B element in the TNF-beta promoter. *Cytokine* **2**, 389-397, (1990).
- 199 Mialon, A. *et al.* Identification of nucleolar effects in JNK-deficient cells. *FEBS Lett* **582**, 3145-3151, (2008).
- 200 Miller, B. S. & Zandi, E. Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem* **276**, 36320-36326., (2001).
- 201 Minden, A. *et al.* c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* **14**, 6683-6688, (1994).
- 202 Mineva, N. D., Rothstein, T. L., Meyers, J. A., Lerner, A. & Sonenshein, G. E. CD40 ligand-mediated activation of the de novo RelB NF-kappaB synthesis pathway in transformed B cells promotes rescue from apoptosis. *J Biol Chem* **282**, 17475-17485, (2007).

- 203 Miyazaki, K. *et al.* Differential usage of alternate promoters of the human stress response gene ATF3 in stress response and cancer cells. *Nucleic Acids Res* **37**, 1438-1451, (2009).
- 204 Mordmüller, B., Krappmann, D., Esen, M., Wegener, E. & Scheidereit, C. Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF-kappaB-p52 generation by a co-translational mechanism. *EMBO Rep* **4**, 82-87, (2003).
- 205 Mori, N. & Prager, D. Transactivation of the interleukin-1alpha promoter by human T-cell leukemia virus type I and type II Tax proteins. *Blood* **87**, 3410-3417, (1996).
- 206 Moriuchi, H., Moriuchi, M. & Fauci, A. S. Nuclear factor-kappa B potently up-regulates the promoter activity of RANTES, a chemokine that blocks HIV infection. *J Immunol* **158**, 3483-3491, (1997).
- 207 Morton, S., Davis, R. J., McLaren, A. & Cohen, P. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J* **22**, 3876-3886, (2003).
- 208 Motohashi, H., Shavit, J. A., Igarashi, K., Yamamoto, M. & Engel, J. D. The world according to Maf. *Nucleic Acids Res* **25**, 2953-2959, (1997).
- 209 Mukaida, N., Okamoto, S., Ishikawa, Y. & Matsushima, K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* **56**, 554-558, (1994).
- 210 Müller, J. R. & Siebenlist, U. Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways. *J Biol Chem* **278**, 12006-12012, (2003).
- 211 Muller, S. *et al.* c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **275**, 13321-13329, (2000).
- 212 Munoz, L. & Ammit, A. J. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **58**, 561-568, (2010).
- 213 Musti, A. M., Treier, M. & Bohmann, D. Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* **275**, 400-402, (1997).
- 214 Nakamura, N. *et al.* Expression of BAFF-R (BR3) in normal and neoplastic lymphoid tissues characterized with a newly developed monoclonal antibody. *Virchows Archiv* **447**, 53-60, (2005).
- 215 Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J., Jr. & Sledge, G. W., Jr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* **17**, 3629-3639, (1997).
- 216 Ni, H., Wang, X. S., Diener, K. & Yao, Z. MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 492-496, (1998).
- 217 Nishina, H. *et al.* Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* **385**, 350-353, (1997).
- 218 Nishizawa, M. & Nagata, S. Regulatory elements responsible for inducible expression of the granulocyte colony-stimulating factor gene in macrophages. *Mol Cell Biol* **10**, 2002-2011, (1990).
- 219 Nonaka, M. *et al.* Aberrant NF-kappaB2/p52 expression in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and CD30-transformed rat fibroblasts. *Oncogene* **24**, 3976-3986, (2005).

- 220 O'Hagan, R. C., Tozer, R. G., Symons, M., McCormick, F. & Hassell, J. A. The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene* **13**, 1323-1333, (1996).
- 221 O'Neill, L. A. J., Fitzgerald, K. A. & Bowie, A. G. The Toll IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol.* **24**, 286-289, (2003).
- 222 Orian, A. *et al.* Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem* **270**, 21707-21714, (1995).
- 223 Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866, (1999).
- 224 Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L. & Maniatis, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**, 773-785., (1994).
- 225 Papavassiliou, A. G., Treier, M. & Bohmann, D. Intramolecular signal transduction in c-Jun. *EMBO J* **14**, 2014-2019, (1995).
- 226 Park, J. I. *et al.* Transforming growth factor-beta1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kappaB, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene* **22**, 4314-4332, (2003).
- 227 Paul, N. L. *et al.* Lymphotoxin activation by human T-cell leukemia virus type I-infected cell lines: role for NF-kappa B. *J Virol* **64**, 5412-5419, (1990).
- 228 Pfarr, C. M. *et al.* Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* **76**, 747-760, (1994).
- 229 Postle, K., Nguyen, T. T. & Bertrand, K. P. Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. *Nucleic Acids Res* **12**, 4849-4863, (1984).
- 230 Pramanik, R. *et al.* p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. *J Biol Chem* **278**, 4831-4839, (2003).
- 231 Price, M. A., Rogers, A. E. & Treisman, R. Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *EMBO J* **14**, 2589-2601, (1995).
- 232 Proudfoot, A. E. *et al.* The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem* **276**, 10620-10626, (2001).
- 233 Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. & Woodgett, J. R. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670-674, (1991).
- 234 Rane, M. J. *et al.* p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J Biol Chem* **276**, 3517-3523, (2001).

- 235 Ranuncolo, S. M., Pittaluga, S., Evbuomwan, M. O., Jaffe, E. S. & Lewis, B. A. Hodgkin lymphoma requires stabilized NIK and constitutive RelB expression for survival. *Blood* **120**, 3756-3763, (2012).
- 236 Rayet, B. & Gelinas, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* **18**, 6938-6947, (1999).
- 237 Razani, B. *et al.* Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation. *Sci Signal* **3**, ra41, (2010).
- 238 Reed, D. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relationship to tuberculosis. *J Hopkins Hosp Rep* **10**, 133-196, (1902).
- 239 Reynolds, A. *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**, 326-330, (2004).
- 240 Roberts, M., Luo, X. & Chegini, N. Differential regulation of interleukins IL-13 and IL-15 by ovarian steroids, TNF-alpha and TGF-beta in human endometrial epithelial and stromal cells. *Mol Hum Reprod* **11**, 751-760, (2005).
- 241 Roberts, P. J. & Der, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291-3310, (2007).
- 242 Roebuck, K. A. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 429-438, (1999).
- 243 Rose-John, S. & Neurath, M. F. IL-6 trans-Signaling: The Heat Is On. *Immunity* **20**, 2-4, (2004).
- 244 Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G. & Karin, M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* **395**, 297-300., (1998).
- 245 Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuerne, E. & Nathans, D. jun-D: a third member of the jun gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1500-1503, (1989).
- 246 Ryder, K., Lau, L. F. & Nathans, D. A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1487-1491, (1988).
- 247 Ryseck, R. P. & Bravo, R. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* **6**, 533-542, (1991).
- 248 Sabapathy, K. *et al.* Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* **15**, 713-725, (2004).
- 249 Saitoh, Y. *et al.* Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* **111**, 5118-5129, (2008).
- 250 Scheidereit, C., Heguy, A. & Roeder, R. G. Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter in vitro. *Cell* **51**, 783-793, (1987).
- 251 Schreck, R. & Baeuerle, P. A. NF-kappa B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol Cell Biol* **10**, 1281-1286, (1990).
- 252 Schutte, J. *et al.* jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* **59**, 987-997, (1989).

- 253 Schwarzer, R., Dorken, B. & Jundt, F. Notch is an essential upstream regulator of NF-kappaB and is relevant for survival of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leukemia* **26**, 806-813, (2012).
- 254 Sen, R. & Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-928, (1986).
- 255 Senftleben, U. *et al.* Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**, 1495-1499., (2001).
- 256 Serfling, E. *et al.* Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. *EMBO J* **8**, 465-473, (1989).
- 257 Shaffer, A. L., Rosenwald, A. & Staudt, L. M. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **2**, 920-932, (2002).
- 258 Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A. & Jongeneel, C. V. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* **171**, 35-47, (1990).
- 259 Shen, F., Hu, Z., Goswami, J. & Gaffen, S. L. Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes. *J Biol Chem* **281**, 24138-24148, (2006).
- 260 Shimizu, H., Mitomo, K., Watanabe, T., Okamoto, S. & Yamamoto, K. Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol Cell Biol* **10**, 561-568, (1990).
- 261 Shinozaki, S., Mashima, H., Ohnishi, H. & Sugano, K. IL-13 promotes the proliferation of rat pancreatic stellate cells through the suppression of NF-kappaB/TGF-beta1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **393**, 61-65, (2010).
- 262 Sica, A. *et al.* Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* **272**, 30412-30420, (1997).
- 263 Sica, A. *et al.* The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-kappa B binds to the intronic region of the human interferon-gamma gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1740-1744, (1992).
- 264 Smeal, T., Angel, P., Meek, J. & Karin, M. Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev* **3**, 2091-2100, (1989).
- 265 Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M. & Karin, M. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* **354**, 494-496, (1991).
- 266 Smeal, T., Hibi, M. & Karin, M. Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *EMBO J* **13**, 6006-6010, (1994).
- 267 Sng, J. C. G., Taniura, H. & Yoneda, Y. A tale of early response genes. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 606-612, (2004).
- 268 Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D. & Paya, C. V. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* **277**, 1405-1418., (2002).

- 269 Son, Y. H. *et al.* Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **51**, 71-77, (2008).
- 270 Stanelle, J., Döring, C., Hansmann, M.-L. & Küppers, R. Mechanisms of aberrant GATA3 expression in classical Hodgkin lymphoma and its consequences for the cytokine profile of Hodgkin and Reed/Sternberg cells. *Blood* **116**, 4202-4211, (2010).
- 271 Stathopoulos, G. T. *et al.* Host nuclear factor-kappaB activation potentiates lung cancer metastasis. *Mol Cancer Res* **6**, 364-371, (2008).
- 272 Staudt, L. M. The molecular and cellular origins of Hodgkin's disease. *J Exp Med* **191**, 207-212, (2000).
- 273 Staudt, L. M. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000109, (2010).
- 274 Stein, B. *et al.* Ultraviolet-radiation induced c-jun gene transcription: two AP-1 like binding sites mediate the response. *Photochem Photobiol* **55**, 409-415, (1992).
- 275 Stein, B. *et al.* Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* **12**, 3879-3891, (1993).
- 276 Stein, H. *et al.* [Epstein-Barr virus associated lymphocyte proliferation]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **76**, 79-95, (1992-a).
- 277 Stein, H. *et al.* The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* **66**, 848-858, (1985).
- 278 Sternberg, C. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Heilkunde* **19**, 21-90, (1898).
- 279 Struyf, S. *et al.* Diverging binding capacities of natural LD78beta isoforms of macrophage inflammatory protein-1alpha to the CC chemokine receptors 1, 3 and 5 affect their anti-HIV-1 activity and chemotactic potencies for neutrophils and eosinophils. *Eur J Immunol* **31**, 2170-2178, (2001).
- 280 Sun, S. C. Controlling the fate of NIK: a central stage in noncanonical NF-kappaB signaling. *Sci Signal* **3**, pe18, (2010).
- 281 Takeda, K. & Akira, S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* **16**, 3-9, (2004).
- 282 Tang, C. H., Hsu, C. J. & Fong, Y. C. The CCL5/CCR5 axis promotes interleukin-6 production in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **62**, 3615-3624, (2010).
- 283 Tegethoff, S., Behlke, J. & Scheidereit, C. Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **23**, 2029-2041, (2003).
- 284 Tichelaar, J. W., Zhang, Y., LeRiche, J. C., Lam, S. & Anderson, M. W. Activation of the Akt/nuclear factor-kappaB signaling axis in developing lung neoplasia. *Chest* **125**, 153S, (2004).
- 285 Torabian, S. & Kashani-Sabet, M. Biomarkers for melanoma. *Curr Opin Oncol* **17**, 167-171, (2005).

- 286 Tournier, C. *et al.* Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**, 870-874, (2000).
- 287 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354, (1979).
- 288 Treier, M., Staszewski, L. M. & Bohmann, D. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* **78**, 787-798., (1994).
- 289 Turner, R. & Tjian, R. Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* **243**, 1689-1694, (1989).
- 290 Vallabhapurapu, S. *et al.* Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* **9**, 1364-1370, (2008).
- 291 van Dam, H. & Castellazzi, M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* **20**, 2453-2464, (2001).
- 292 van Dam, H. *et al.* Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J* **12**, 479-487, (1993).
- 293 van Dam, H. *et al.* ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *Embo J* **14**, 1798-1811, (1995).
- 294 Varfolomeev, E. *et al.* IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669-681, (2007).
- 295 Vickers, E. R. *et al.* Ternary complex factor-serum response factor complex-regulated gene activity is required for cellular proliferation and inhibition of apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* **24**, 10340-10351, (2004).
- 296 Vince, J. E. *et al.* IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 682-693, (2007).
- 297 Vincent, S. R., Sebben, M., Dumuis, A. & Bockaert, J. Neurotransmitter regulation of MAP kinase signaling in striatal neurons in primary culture. *Synapse* **29**, 29-36, (1998).
- 298 Vinciguerra, M. *et al.* Negative charged threonine 95 of c-Jun is essential for c-Jun N-terminal kinase-dependent phosphorylation of threonine 91/93 and stress-induced c-Jun biological activity. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 307-316, (2008).
- 299 Wang, Z. *et al.* Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 represses c-Jun NH2-terminal kinase-mediated apoptosis via NF-kappaB regulation. *J Biol Chem* **283**, 21011-21023, (2008).
- 300 Watanabe, M. *et al.* JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* **65**, 7628-7634, (2005).
- 301 Watt, P., Lamb, P., Squire, L. & Proudfoot, N. A factor binding GATAAG confers tissue specificity on the promoter of the human zeta-globin gene. *Nucleic Acids Res* **18**, 1339-1350, (1990).

- 302 Weitzman, J. B., Fiette, L., Matsuo, K. & Yaniv, M. JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell* **6**, 1109-1119, (2000).
- 303 Weniger, M. A. *et al.* Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* **25**, 2679-2684, (2006).
- 304 Westermarck, J. *et al.* The DEXD/H-box RNA helicase RHII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *EMBO J* **21**, 451-460, (2002).
- 305 White, L. R., Toft, M., Kvam, S. N., Farrer, M. J. & Aasly, J. O. MAPK-pathway activity, Lrrk2 G2019S, and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* **85**, 1288-1294, (2007).
- 306 Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* **74**, 589-607, (1996).
- 307 Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**, 143-180, (1999).
- 308 Widmer, U., Manogue, K. R., Cerami, A. & Sherry, B. Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J Immunol* **150**, 4996-5012, (1993).
- 309 Wolf, J. *et al.* Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* **87**, 3418-3428, (1996).
- 310 Wood, K. M., Roff, M. & Hay, R. T. Defective IkappaBalpha in Hodgkin cell lines with constitutively active NF-kappaB. *Oncogene* **16**, 2131-2139, (1998).
- 311 Worm, M. M., Tsytsykova, A. & Geha, R. S. CD40 ligation and IL-4 use different mechanisms of transcriptional activation of the human lymphotoxin alpha promoter in B cells. *Eur J Immunol* **28**, 901-906, (1998).
- 312 Wu, W. S., Lin, J. K. & Wu, F. Y. Differential induction of c-fos and c-jun proto-oncogenes and AP-1 activity by tumor promoter 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate in cells at different stages of tumor promotion in vitro. *Oncogene* **7**, 2287-2294, (1992).
- 313 Xerri, L. *et al.* In situ expression of the IL-1-alpha and TNF-alpha genes by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Int J Cancer* **50**, 689-693, (1992).
- 314 Xiao, G. *et al.* Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *Embo J* **20**, 6805-6815., (2001).
- 315 Xu, G. *et al.* Crystal structure of inhibitor of kappaB kinase beta. *Nature* **472**, 325-330, (2011).
- 316 Xu, L. G. & Shu, H. B. TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-kappa B activation and IL-10 production. *J Immunol* **169**, 6883-6889, (2002).
- 317 Yamaguchi, T., Naruishi, K., Arai, H., Nishimura, F. & Takashiba, S. IL-6/sIL-6R enhances cathepsin B and L production via caveolin-1-mediated JNK-AP-1 pathway in human gingival fibroblasts. *J Cell Physiol* **217**, 423-432, (2008).

- 318 Yamaoka, S. *et al.* Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 1231-1240., (1998).
- 319 Yilmaz, Z. B., Weih, D. S., Sivakumar, V. & Weih, F. RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *Embo J* **22**, 121-130, (2003).
- 320 Yin, L. *et al.* Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* **291**, 2162-2165., (2001).
- 321 Yoneda, T., Tanaka, S. & Hata, K. Role of RANKL/RANK in primary and secondary breast cancer. *World J Orthop* **4**, 178-185, (2013).
- 322 Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M. & Karin, M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* **91**, 243-252., (1997).
- 323 Zarnegar, B., Yamazaki, S., He, J. Q. & Cheng, G. Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3503-3508, (2008).
- 324 Zhang, W. & Liu, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* **12**, 9-18, (2002).
- 325 Zheng, B. *et al.* MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood* **102**, 1019-1027, (2003).